

الطرق الحديثة لتحليل

الأحماض الأمينية

وتقييم نوعية البروتين

دكتور

رضوان صدقي فرج



**ISO
9002**

Certificate No. 82210
03/05/2001



المكتبة الأكاديمية

شركة مساهمة مصرية



المكتبة الأكاديمية

شركة مساهمة مصرية

الحاصلة على شهادة الجودة

ISO 9002

Certificate No.: 82210

03/05/2001

الطرق الحديثة لتحليل

الأحماض الأمينية

وتقييم نوعية البروتين

الطرق الحديثة لتحليل

الأحماض الأمينية

وتقييم نوعية البروتين

تأليف
دكتور
رضوان صدقي فرج محمد
أستاذ الكيمياء الحيوية
كلية الزراعة — جامعة القاهرة



الناشر
المكتبة الأكاديمية
شركة مساهمة مصرية

٢٠٠٤

حقوق النشر

الطبعة الأولى ٢٠٠٤م - ١٤٢٤هـ

حقوق الطبع والنشر © جميع الحقوق محفوظة للناسر :

المكتبة الأكاديمية

شركة مساهمة مصرية

راس المال المصدور والنفع ٩٩٢٣,٨٠٠ جنيه مصري

١٢١ شارع التحرير - الدقى - الجيزة

القاهرة - جمهورية مصر العربية

تليفون : ٧٤٨٥٢٨٢ - ٣٣٦٨٢٨٨ (٢٠٢)

فاكس : ٧٤٩١٨٩٠ (٢٠٢)

لا يجوز استساخ أى جزء من هذا الكتاب بأى طريقة
كانت إلا بعد الحصول على تصريح كتابى من الناسر .

إهداء

إلى أسرّتي الغالية
وفاءً وإعترافاً بفضلها وتضحيّتها بوقتها
لاتمام تأليف هذا الكتاب

مقدمة

يعتبر الحمض الأميني الوحدة الأساسية لتكوين البروتينات والبيبتيدات ومن المعروف أن البروتينات من ضمن المواد النباتية الأساسية التي تدخل في تركيب مركبات عديدة ذات وظائف فسيولوجية مهمة جداً للإنسان وباقي الكائنات الحية وتعتبر الحياة مستحيلة بدون البروتينات بالاضافة إلى ذلك، نوعية الأحماض الأمينية التي لها دور هام في مجال التغذية وتحديد القيمة الغذائية للأطعمة كما أن التمثيل الغذائي غير السليم للأحماض الأمينية يؤدي إلى حدوث أمراض وراثية خطيرة. ومن هذا يتبين مدى أهمية التعرف وصفا وكميا على أنواع الأحماض الأمينية.

تتطلب بعض الكائنات الحية مثل الإنسان والحيوان أنواع معينة من الأحماض الأمينية لا يستطيع تخليقها داخل أنسجتها وقد أطلق عليها الأحماض الأمينية الأساسية (الضرورية) والتي لا بد أن نتناولها في الغذاء. على ذلك، يجب أن تحتوى الوجبات الغذائية المتزنة على جميع هذه الأحماض الأساسية بتركيزات مناسبة. ومما هو جدير بالذكر، أن النبات فقط من بين الكائنات الحية الذي يستطيع تخليق الأحماض الأمينية الأساسية، وكذلك تستطيع بعض الثدييات أيضا تخليق عدد محدود من تلك الأحماض الأمينية.

ونظرا لانتشار الأحماض الأمينية بأنواعها المختلفة وبكميات متباينة بين الكائنات الحية، فانه توجد ثلاث قطاعات أساسية تهتم بتقدير الأحماض الأمينية وهي الطبية والصناعية والبحثية. فمن الناحية الطبية تدخل الأحماض الأمينية في مجالات الأغراض التشخيصية وتنظيم الغذاء ومن الناحية الصناعية فهي تدخل في مراقبة الجودة ومن الناحية البحثية وهي التي تجرى في الجامعات والمعاهد العلمية فان دراسة الأحماض تخدم فروع العلوم المختلفة مثل: الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية والميكروبيولوجيا والمعامل المركزية الخدمية.

ويتعرض هذا الكتاب إلى المشاكل التي تحدث أثناء التحليل المائي للبروتينات والبيبتيدات بغرض الحصول على الأحماض الأمينية الحرة لدراسة مكوناتها كذلك الطرق المختلفة لتحضير مشتقات الأحماض الأمينية للكشف عنها وتقديرها كميًا سواء باستخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل أو جهاز تحليل الأحماض الأمينية ثم مقارنة كفاءة هذه الطرق مع بعضها البعض. وقد ذكرت التطبيقات المختلفة التي تعتمد على نوعية الأحماض الأمينية، فعلى سبيل المثال الكشف عن غش اللحوم الحمراء بلحم الدجاج وتحديد المصدر النباتي الذي استخدم في تحضير المنتجات الغذائية.

وأسأل الله أن يفيد هذا الكتاب ولو بالجزء اليسير للسادة القائمين بالبحوث الأكاديمية والتطبيقية.

المحتويات

الصفحة	الموضوع
	أولاً: الأحماض الأمينية
١٥	١-١- التركيب الكيميائي والخصائص العامة
٢١	١-٢- الحروف المختصرة
٢٢	١-٣- الخواص الأيونية
٢٦	ثانياً: تقسيم الأحماض الأمينية بالغذاء.
٢٩	ثالثاً: علاقة الأحماض الأمينية بالغذاء.
٣٢	١-٣- وجود الأحماض الأمينية في الطعام
	رابعاً: تحليل الأحماض الأمينية في المنتجات الغذائية
٣٤	١-٤- تحليل الأحماض الأمينية الحرة
٣٥	٢-٤- تحليل الأحماض الأمينية المرتبطة
٣٨	٣-٤- تحضير العينات والمعاملات التي تجري عليها
٤١	٤-٤- طرق التحليل المائي للأغذية ومواد العلاف
	خامساً: تقدير الأحماض الأمينية في الطعام والأعلاف
٤٥	٥-١ طرق الكشف عن الأحماض الأمينية (اللونية- الفلورة)
٥١	٥-٢- التقدير الكمي باستخدام التحليل الكروماتوجرافي الغازي
٥٣	٥-٣- مشتقات الأحماض الأمينية للفصل الكروماتوجرافي السائلي
٥٤	٥-٣-١- الننهيدرين
٥٧	٥-٣-٢- أورثو فيثالدهيد
٥٨	٥-٣-٣- فلوروسكامين

٥٩	٥-٣-٤- فلوروثنائي نيترو بنزين
٦٠	٥-٣-٥- فينائل أيزوثيوسيانات
٦١	٥-٣-٦- فينائل ثيوهيدرانتيون
٦٢	٥-٣-٧- فلورونيل ميثوكسي كاربونيل كلوريد
٦٢	٥-٣-٨- كلوريد الدانسيل
٦٤	٥-٣-٩- كلوريد الدابسيل

سادساً: التحليل الكروماتوجرافي السائل

٦٨	٦-١- أساسيات
٧٢	٦-٢- تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل
٨٤	٦-٣- الطور المتحرك
٨٨	٦-٤- الاطوار الثابتة المرتبطة كيمياوياً
٩٢	٦-٥- التقدير الكمي
٩٧	٦-٦- ظروف الفصل لبعض مشتقات الأحماض الأمينية

١٠٣	سابعاً: آلية فصل الأحماض الأمينية باستخدام المبادلات الأيونية
١٠٦	٧-١- تحضير مواد التبادل الأيوني

١١٤	ثامناً: جهاز تحليل الأحماض الأمينية
١١٨	٨-١- ملاحظات عامة عن فصل الأحماض الأمينية
١٢٢	٨-٢- تقدير الأحماض الأمينية كميًا

تاسعاً: تطبيقات عامة على تحليل الأحماض الأمينية

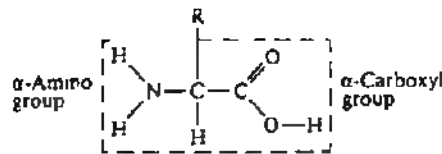
١٢٤	٩-١-١- استخدام تركيب الأحماض الأمينية لنتيج البذره
١٢٥	٩-٢- استخدام تركيب الأحماض الأمينية في تمييز الجنس
١٢٦	٩-٣- الكشف عن تلوث الطعام بالسموم الفطرية

- ٩-٤- التقييم الغذائي لبعض البذور seeds والنقل nuts ١٢٧
- ٩-٥- تقييم بروتين الأغذية ١٣٢
- ٩-٦- تأثير التركيب الفراغى للأحماض الأمينية على القيمة الغذائية للبروتين ١٣٣
- ٩-٧- دراسة المعاملات الصناعية على القيمة الغذائية للبروتين ١٣٦
- ٩-٨- الكشف على غش الأغذية ١٣٧
- عاشراً: المراجع ١٤٢
- حادى عشر: نبذة عن المؤلف ١٤٥

أولاً: الأحماض الأمينية

تعتبر الأحماض الأمينية ضمن المكونات الأساسية لجميع الأغذية ومع ذلك فإنه يوجد اختلافاً كبيراً في محتواها من الأحماض الأمينية. وهي توجد كمكون أساسي في تكوين البروتينات، وعند هضم البروتين فإنه يعطى أحماض أمينية حرة وبتيدات قصيرة السلسلة تمتص بواسطة الجسم. وتستخدم الأحماض الأمينية في الغذاء لإنتاج البروتينات اللازمة لإعطاء التركيب البنائي والوظائف الفسيولوجية للأنسجة المختلفة وكذلك الهرمونات وأعضاء الجهاز العصبي. ومن المعروف أن احتياجات الحيوانات للأحماض الأمينية تختلف عن بعضها البعض تبعاً للنوع. وكذلك تختلف احتياجات الكائنات الحية من الأحماض الأمينية طبقاً للعمر. لذلك لابد من وجود كميات مناسبة من كل حمض أميني في الغذاء. والجدول في صفحة ٢ يبين احتياجات الإنسان من الأحماض الأمينية الأساسية طبقاً لمراحل النمو.

وتعتبر الأحماض الأمينية مركبات عضوية ذات أوزان جزيئية منخفضة تتراوح ما بين ١٠٠ - ٢٠٠ وتحتوي على الأقل على مجموعة كربوكسيل واحدة (-COOH) ومجموعة أمين واحدة (-NH₂). وترجع الاختلافات بين الأحماض الأمينية المختلفة إلى طبيعة مجموعات السلاسل الجانبية (-R) والتي لها أهمية أساسية وتميز كل حمض أميني عن الآخر.



الرمز العام للحمض الأميني

احتياجات الإنسان من الأحماض الأمينية الأساسية

العمر			
البالغ	١٠ - ١٢ سنة	٣ - ٦ أشهر	الحمض الأميني (مجم / كجم)
١٠	٣٠	٧٠	أيزوليوسين
١٤	٤٥	١٦١	ليوسين
١٢	٦٠	١٠٣	ليسين
١٣	٢٧	٥٨	ميثيونين + سستين
١٤	٢٧	١٢٥	فينايل آلانين + ثيروزين
٧	٣٥	٧٨	ثريونين
٤	٤	١٧	تريثوفان
١٠	٣٣	٩٣	فالين
٨٤	٢٦١	٧١٤	كمية الأحماض الأمينية الأساسية الكلية
٠,١٥	٠,٣٣	٠,٣٩	كمية الأحماض الأمينية الأساسية الكلية: كمية البروتين المطلوبة

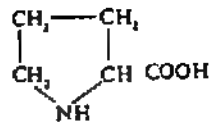
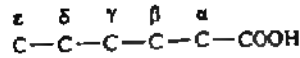
من المعروف أن الهستيدين هو حمض أميني أساسي بالنسبة للأطفال ويحتاج البالغ الى مستويات منخفضة منه. هذه الأرقام مأخوذة من FAO/ WHO (1973).

ومن معرفة التركيب الكيميائي للمجموعة R فإنه يمكن استنتاج خواص الأحماض الأمينية وبالتبعية عند معرفة خواص الحمض الأميني فإنه يمكن التعرف على ماهية المجموعة R ثم الحمض الأميني، والجدير بالذكر أنه يوجد تقريبا ١٨ حمض أميني مختلف في البروتينات الطبيعية.

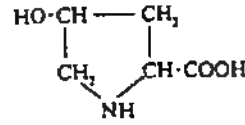
وفي الطبيعة توجد الأحماض الأمينية في الصورة اليسارية (L-form) وتوجد أيضا في الطبيعة بعض الأحماض الأمينية في الصورة اليمينية (D-Form) ولكنها متخصصة جداً فهي عادة ما توجد مرتبطة مع مركبات أخرى غالبا ما تكون سامة.

١-١ التركيب والخصائص العامة للأحماض الأمينية:

يوجد تقريبا ٢٠ حمض أميني في البروتينات وكلها ألفا أمينو ماعدا حمضين ألفا ايمينو وهما البرولين والهيدروكسي برولين. ويطلق على الأحماض الأمينية ألفا نظرا لإرتباط مجموعة الأمين على ذرة الكربون ألفا للسلسلة وهي ذرة الكربون المجاورة لمجموعة الكربوكسيل. والجدير بالذكر أن كلا المجموعتين الكربوكسيل والأمين تكونا متصلتين بذرة كربون واحدة.



Proline



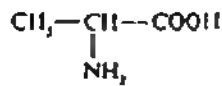
Hydroxyproline

α -Imino acids.

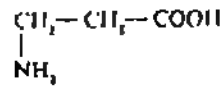
كما يوجد عديد من المركبات لها تركيب كيميائي يشابه تركيب الأحماض الأمينية منتشرة في الطبيعة ولا توجد في البروتين ولها أهمية خاصة في التمثيل الغذائي أو كمكونات للنباتات أو كمضادات حيوية Antibiotics.

والرموز التالية تبين التركيب الكيميائي لبعض منها:

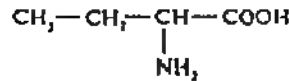
α - Alanine



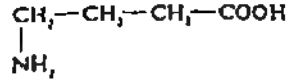
β - Alanine



α - Aminobutyric acid



γ - Aminobutyric acid



Structure of alternative forms of amino acids

والجدول التالي يبين بعض خواص المركبات القريبة في تركيبها الكيميائي للأحماض الأمينية التي توجد في نوعية خاصة جدا من البروتينات أو في الصورة الحرة.

الحمض الأميني	أهمية التمثيل الغذائي أو مصدر النسيج	الرمز
ألفا أمينو حمض الببوتريك	أنسجة النبات والحيوان	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH}$
ألفا جاما ثنائي أمين حمض الببوتريك	مضادات حيوية	$\text{CH}_2\text{-NH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH}$
بيتا الأنين	معاون إنزيمي CoA	$\text{CH}_2\text{-NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
جاما امينو حمض الببوتريك	أنسجة المخ	$\text{CH}_2\text{-NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
الفا ابسلون ثنائي امينو حمض بيميليك Pimelic	جدر الخلايا البكتيرية	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CHNH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{N-CH-COOH} \end{array}$

التركيب الكيميائي للأحماض الأمينية ألفا اليسارية الموجودة في البروتينات

المجموعة	الاسم الشائع	الاسم الكيميائي	التركيب الكيميائي
الأولى	Glycine*	Aminoacetic acid	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Alanine	α -Aminopropionic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Valine	α -Aminoisovaleric acid	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Leucine	α -Aminoisocaproic acid	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Isoleucine	α -Amino- β -methylvaleric acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
أحماض أمينية لها سلاسل جانبية بها مجاميع أيدروكسيلية			
الثانية	Serine	α -Amino- β -hydroxypropionic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Threonine	α -Amino- β -hydroxy-n-butyrac acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
أحماض أمينية لها سلاسل جانبية بها ذرات كبريت			
الثالثة	Cysteine†	α -Amino- β -mercaptopropionic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{SH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Methionine	α -Amino- γ -methylthio-n-butyrac acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
أحماض أمينية لها سلاسل جانبية حامضية أو أميدية			
الرابعة	Aspartic acid	α -Aminosuccinic acid	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Asparagine	γ Amide of α -aminosuccinic acid	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$

*تدل العلامة على أن الجليسين لا يوجد في الصورة اليمينية أو اليسارية نظرا لعدم احتوائه على ذرة كربون غير متناظرة

التركيب الكيميائي للأحماض الأمينية ألفا اليسارية الموجودة في البروتينات

المجموعة	الإسم الشائع	الإسم الكيميائي	التركيب الكيميائي
الرابعة	Glutamic acid	α -Aminoglutaric acid	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
	Glutamine	δ -Amide of α -aminoglutaric acid	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
أحماض أمينية بها سلاسل جانبية قاعدية			
الخامسة	Arginine	α -Amino- δ -guanidino-n valeric acid	$\text{H}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ $\text{C}=\text{NH}$ NH_2
	Lysine	α,ϵ -Diaminocaproic acid	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
	Hydroxylysine*	α,ϵ -Diamino- δ -hydroxy-n-caproic acid	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
	Histidine	α -Amino- β -imidazolepropionic acid	$\text{HN}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
أحماض أمينية بها حلقات عطرية			
السادسة	Phenylalanine	α -Amino- β -phenylpropionic acid	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
	Tyrosine	α -Amino- β -(p-hydroxyphenyl)propionic acid	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
	Tryptophan	α -Amino- β -3-indolepropionic acid	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
أحماض أمينية إيمينية			
السابعة	Proline	Pyrrolidine-2-carboxylic acid	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$
	4-Hydroxyproline	4-Hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_3$

تدل العلامة على أن الهيدروكسي ليسين يوجد فقط في الكولاجين والجيلاتين

الخواص العامة للأحماض الأمينية الشائعة

العضف الأميني	التركيب الجزيئي	الوزن الجزيئي	النقطة ذوبان في الماء (°C)	قيم ثوابت الأقسام	نقطة التعادل	
					الكهربي	التحويل المولي [α] _D
L-Alanine	C ₃ H ₇ O ₂ N	89.09	297	2.34, 9.69	6.01	+2.8 (w, c = 6, 25°C)
L-Arginine	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₄	174.20	244	2.01, 9.04, 12.48	10.76	+12.5 (w, c = 3.5, 20°C)
L-Asparagine	C ₄ H ₈ O ₃ N ₂	132.12	234-235	2.02, 8.80	5.41	-5.42 (w, c = 1.3, 20°C)
L-Aspartic acid	C ₄ H ₇ O ₄ N	133.10	270-271	2.10, 3.86, 9.82	2.98	+4.36 (w, c = 1, 20°C)
L-Cysteine	C ₃ H ₇ O ₂ NS	121.16	240	1.71, 8.27, 10.78	5.02	+9.8 (w, c = 1.3, 30°C)
L-Cysteine	C ₃ H ₇ O ₂ NS ₂	240.30	260-261	1.04, 2.05, 8.0, 10.25	5.02	-223 (1 N HCl, c = 1, 20°C)
Glutamic acid	C ₅ H ₉ O ₄ N	147.13	247 249	2.10, 4.07, 9.47	3.08	+31.4 (6 N HCl, c = 1, 22°C)
L-Glutamine	C ₅ H ₁₀ O ₂ N ₂	146.15	185-186	2.17, 9.13	5.65	+6.5 (w, c = 2, 25°C)
Glycine	C ₂ H ₅ O ₂ N	75.07	233-290	2.35, 9.78	6.06	Not Active
L-Histidine	C ₆ H ₉ O ₂ N ₃	155.16	287	1.77, 6.10, 9.18	7.64	-39.7 (w, c = 1.13, 20°C)
L-Isoleucine	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	131.17	284	4.19 (25°C)	6.02	+11.29 (w, c = 3, 20°C)
L-Leucine	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	131.17	293-295	24.3 (25°C)	5.98	-10.8 (w, c = 2.2, 25°C)
L-Lysine	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₂	146.19	224.5	2.36, 9.60	9.47	+14.6 (w, c = 6.5, 20°C)
L-Methionine	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	149.21	280-282	2.18, 8.95, 10.53	5.74	-8.2 (w, c = 1, 25°C)
L-Phenylalanine	C ₉ H ₉ O ₂ N	165.19	283	53.7 (20°C)	5.48	-35.1 (w, c = 2, 20°C)
L-Proline	C ₅ H ₉ O ₂ N	115.13	220-2	2.28, 9.21	6.30	-80.9 (w, c = 1, 20°C)
L-Serine	C ₃ H ₇ O ₂ N	105.09	228	2.21, 9.15	5.68	-6.8 (w, c = 10, 20°C)
L-Threonine	C ₄ H ₉ O ₃ N	119.12	255-257	90.3 (20°C)	6.16	-28.3 (w, c = 1.1, 26°C)
L-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ O ₂ N ₂	204.22	290-292	2.71, 9.62	5.88	-31.5 (w, c = 0.5, 20°C)
L-Tyrosine	C ₉ H ₉ O ₃ N	181.19	342-344	2.20, 9.11, 10.07	5.63	-10.6 (1 N HCl, c = 4, 22°C)
L-Valine	C ₆ H ₁₁ O ₂ N	117.15	315	2.32, 9.62	5.96	+22.9 (20% HCl, c = 0.8, 23°C)

تدل الحروف W و C على الماء كمذيب والنسبة المئوية للتركيز (وزن/حجم) على التوالي.

٢-١- الحروف المختصرة للأحماض الأمينية Amino acid symbols

الحمض الأميني Amino acid	الرمز بثلاث حروف Three-letter symbol	الرمز بحرف واحد One-letter symbol
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Asn+Asp	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Flu	E
Glu+Gln	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

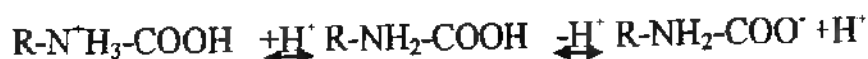
الأحماض الأمينية بصفة عامة مواد غير متطايرة، بلورات بيضاء اللون في الصورة النقية وليس لها درجات انصهار محددة ولكنها تنكسر عند درجات الحرارة التي تتراوح ما بين ١٨٥ و ٣٤٠°م، وعادة لها نشاط ضوئي ما عدا الجليسين، وتذوب إلى حد ما في الماء وتنخفض درجة ذوبانها في الماء إلى حد كبير عند نقطة التعادل الكهربى للجزيء.

والأحماض الأمينية لا تذوب في المذيبات العضوية ما عدا البرولين والهيدروكسي برولين اللذان لهما درجة ذوبان معقولة في كحول الايثانول. وجميع الأحماض الأمينية تكون أملاح ثابتة.

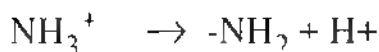
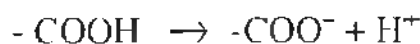
والجداول السابقة تبين التركيب الكيميائى، الرموز المختصرة (حرف واحد-ثلاثة حروف) وخواص الأحماض الأمينية الشائعة.

١-٣- الخواص الايونية Ionic properties

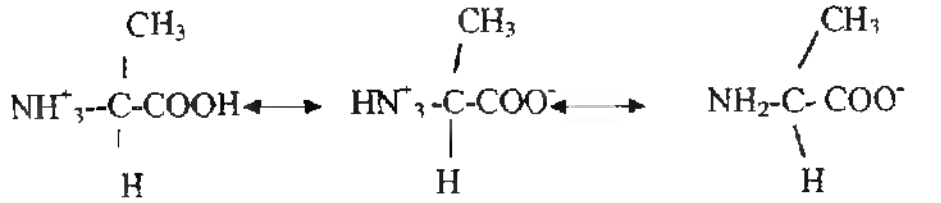
تحتوى الأحماض الأمينية على مجموعات حمضية (-COOH) وقاعدية (-NH₂)، ونتيجة لذلك فإنها يمكن أن تتفاعل كحمض ضعيف وكقاعدة ضعيفة ولذلك تسمى Ampholytes ويطلق على هذا السلوك باسم Amphotropic حيث أنها يمكن أن تكتسب أو تعطى بروتون، والذي يمثله التفاعل التالي:-



وتتأين المجاميع القابلة للتأين في الجرىء في المحلول كما يلي:-



وعلى ذلك يوجد للحمض الأميني في المحلول صورة تسمى ثنائي القطبية Dipolar أو زويتر آيون Zwitter ion، أى أنه في المحلول المائى توجد الأحماض لأمينية في الصورة المشحونة حيث تتأين كلا المجموعتين الكربوكسيلية والأمينية. ونحتوى بعض الأحماض الأمينية على مجاميع أخرى إضافية قابلة للتأين في السلسلة الجانبية، وأن تأين لمجموعة يعتمد على درجة حموضة الوسط (pH)، وكل حمض أميني له درجة حموضة عندها يكون مجموع الشحنات متساويا وبالتالي لا يحمل لجزء أى شحنة وتسمى في هذه الحالة باسم نقطة التعادل الأيونى (Iso-ionic point (PI).



Cationic form

Zwitter ionic form

Anionic form

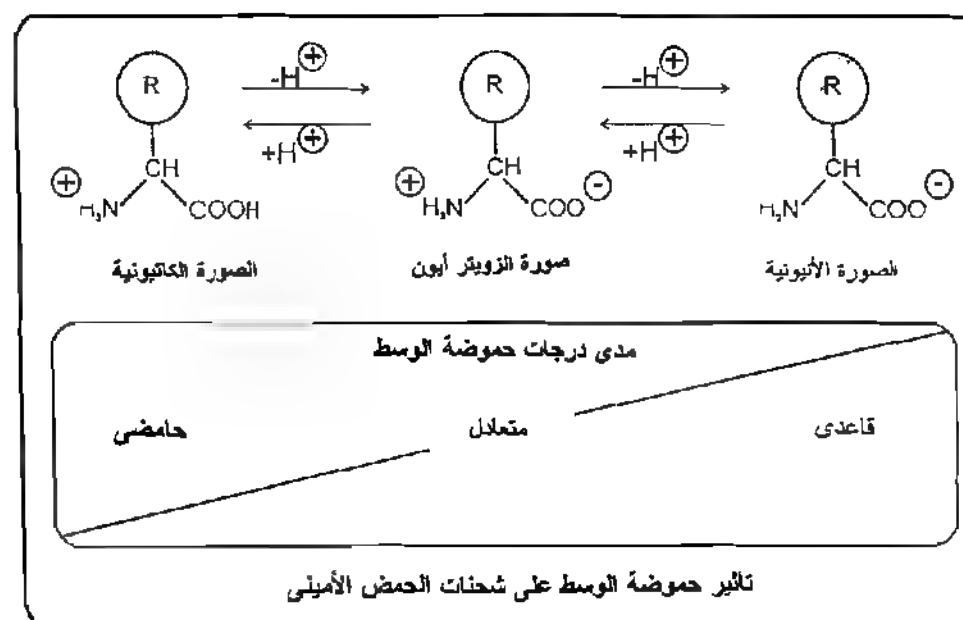
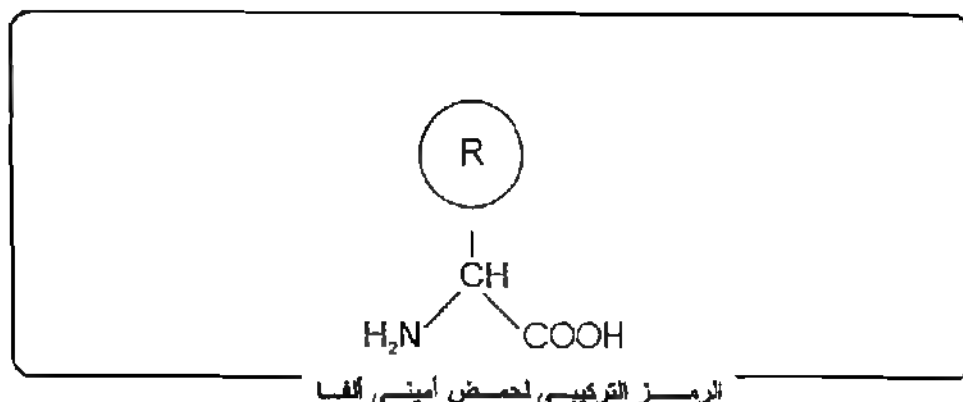
الصورة الكاتيونية

صورة الزويتر آيون

الصورة الأنيونية

تعتمد الشحنات الكلية لأى حمض أميني على درجة حموضة الوسط (pH) وكذلك قيم ثوابت الانقسام (pKa) للمجموعات القابلة للتأين الموجودة. فإذا كانت درجة حموضة الوسط أكبر من ثابت الانقسام للمجموعة فإن الجزء يفقد بروتون. ويحمل الجزء شحنة سالبة وكذلك عند درجات حموضة (pH) منخفضة (توجد تركيزات مرتفعة من البروتونات) تكسب مجموعة الكربوكسيل بروتون وبالتالي تصبح غير مشحونة والشحنة الكلية على الجزء تكون موجبة.

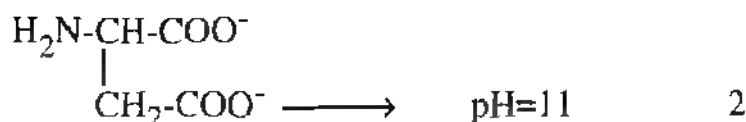
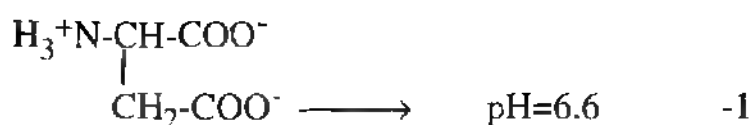
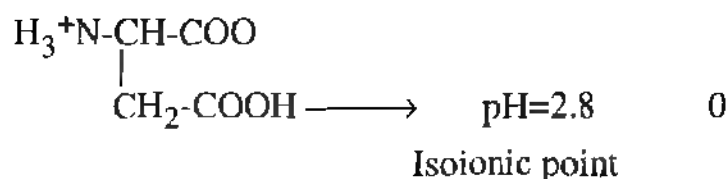
وعند درجات حموضة (pH) مرتفعة (توجد تركيزات منخفضة من البروتونات) تفقد مجموعة الأمين بروتونها وبالتالي تصبح غير مشحونة، والشحنة الكلية على الجزء تكون سالبة. وكذلك إذا كانت درجة حموضة



المحلول أقل من ثابت الانقسام فإن الجزيء يحمل شحنة موجبة. وفي الحقيقة عند درجات حموضة وسط متغيرة نلاحظ أن الأحماض الأمينية توجد في صور أيونية مختلفة وتحمل شحنات مختلفة يمكن استخدامها في عدد من الطرق التحليلية مثل الفصل عن طريق الهجرة في المجال الكهربى electrophoresis والتبادل الأيونى الكروماتوجرافى فى فصل كل حمض أمينى عن الآخر.

والمثال التالى يبين سلوك الحمض الأمينى أسبارتيك فى محاليل مختلفة على درجات حموضة (pH) متباينة

محصلة الشحنات درجة حموضة الوسط حمض اسبارتيك



ثانيا: تقسيم الأحماض الأمينية

أولا: تقسم الأحماض الأمينية تبعا لنوعية التركيب الكيميائي والسلسلة الجانبية كما في الجدول التالي:-

الأمثلة	التركيب الكيميائي للسلسلة الجانبية
Gly, Ala, Val, Leu	الليفاتية
Phe, Tyr, Trp	عطرية
Ser, Thr	هيدروكسيلية
Asp, Glu	كربوكسيلية
Cys, Met	كبريتية
Pro, Hyp	ايمينو
Lys, Arg	أمينو
Asn, Gln	أميد

ثانيا: تقسم الأحماض الأمينية إلى ثلاثة أقسام أساسية بالنسبة لتغذية الإنسان وهي:-

١- ضرورية Essential:

يلزم تناولها في الغذاء ولا يستطيع الجسم تخليقها.

٢- غير ضرورية Non-essential:

يكونها الجسم من مكونات الغذاء

٣- ضرورية تحت ظروف خاصة Conditionally essential:

تختلف باختلاف الحالة.

وبصفة عامة، يقوم الغذاء بتزويد الكائن الحي بكل ما يلزمه (يحتاجه) من مغذيات كبرى أو صغرى لازمة لنموه والحفاظ على حياته على صورة الأمثل. وتستطيع أغلب الكائنات الحية تخليق على الأقل بعض الأحماض (غير الأساسية) من مصادر غذائية أخرى أو من أحماض أمينية أخرى. وعلى ذلك فالأحماض الأمينية التي لا يمكن تكوينها داخليا (أساسية) يلزم الحصول عليها من الطعام. وتوجد أيضا حالات مرضية خاصة بعد العمليات الجراحية تصبح عندها بعض الأحماض الأمينية غير الأساسية أساسية تحت هذه الظروف.

والجدول التالي يبين الأحماض الأمينية التي تقع تحت كل قسم من الأقسام سالفة الذكر.

Essential ضرورية	Non- Essential غير ضرورية	Conditionally Essential ضرورية تحت ظروف خاصة
Histidine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Phenylalanine Threonine Tryptophan Valine	Alanine Arginine Asparagine Aspartate Cysteine Glutamate Glutamine Glycine Proline Serine Tyrosine	Arginine ^a Glutamine ^b Cysteine ^c Tyrosine ^d I.e., Leu., Val ^e Taurine ^f

- (a) قد يكون ضروريا في تغذية الأطفال أو التغذية الكاملة عن طريق القناة الهضمية Parenteral nutrition
- (b) يساعد على إسراع العلاج من النزلات المعوية.
- (c) حمض أساسي في الأطفال قبل سن البلوغ وبصفة عامة جميع الأحماض الكبريتية أساسية للأطفال.
- (d) حمض أساسي في حالة مرضى فينيل كيتويوريا Phenyl keto urea (التمثيل الغذائي غير السليم للحمض فينيل الآنين).
- (e) أساسي في حالة مرضى الكبد Hepatic disease.
- (f) أساسي في حالة الحيوانات حديثة الولادة وبصفة خاصة القطط.

ثالثا: علاقة الأحماض الأمينية بالغذا.

الجدول التالى يبين الاحتياجات اليومية من الأحماض الأمينية الأساسية للإنسان.

L-Amino acid	Adults (gram/day)
Tryptophan	0.25
Phenyl alanine	1.10
Lysine	0.80
Threonine	0.50
Valine	0.80
Methionine	1.10
Leucine	1.10
Iso Leucine	0.70

لذلك تظهر أهمية تقدير الأحماض الأمينية فى المصادر المختلفة كما فى الحالات التالية:-

(١) التغذية على مصدر واحد

فى حالة تحديد نوعية التغذية Dietary restriction أو فى حالات التغذية على مصدر واحد فان مكونات هذا المصدر لا تفى بكل الاحتياجات البيولوجية وأنه يلزم فى هذه الحالة معرفة تركيب الأحماض الأمينية فى أطعمة الأطفال والأغذية التى تستخدم فى تغذية البالغين الناتجة من مصدر وحيد للتغذية .Sole source

(٢) أهمية إضافة الأحماض الأمينية لبعض الأغذية

توجد حالات لا بد من إجراء التحليل لمعرفة إذا ما كان مضاف حمض أميني أو أكثر إلى الطعام. وهذه حقيقة هامة عند التغذية الخاصة، إذا كان المطلوب تحسين نوعية التغذية لمصدر بروتيني بالاستعانة بـ حمض أميني معين. فمثلاً يضاف الحمض الأميني ميثيونين لتدعيم فول الصويا في أطعمة الأطفال، كذلك تضاف بعض المركبات لتدعيم التغذية الطبية مثل التدعيم بالجلوتامين أو الأرجينين للمرضى تحت الضغط العصبي. ومن الضروري التأكد من أن المصانع تصيف الكمية المطلوبة من الحمض الأميني وتعتبر كشرط من جودة الصناعة.

(٣) غياب بعض الأحماض الأمينية ذات القيمة الحيوية

يجرى التحليل المائي للأحماض الأمينية لإظهار غياب واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية حيث توجد حالات مرضية خاصة والتي ترتبط بوجود أحماض أمينية معينة وهي ضرورية للصحة. ومن أمثلة ذلك مرض الفينيل كيتوريوريا (Phenyl Keto Urea (PKU ولذلك يجب تحديد كمية الفينيل الآنين. كما أن وجود الأحماض المتفرعة مثل Lsoleucine, Leucine, Valine تظهر مشاكل بالنسبة لمرضى (Maple syrup urine disease (MSUD. لذلك لا بد من تحليل الأطعمة للأشخاص للتحقق من الحد الأعلى من هذه الأحماض الأمينية. وتوجد بعض المصانع نضع بطاقة تحذيرية على الأطعمة فمثلاً «هذا المنتج يحتوي على فينيل الآنين» أو تكتب تركيزات أحماض أمينية معينة خاصة بالمنتج. ومثال آخر لهذه الحالة أنه لا بد من ذكر تركيز أحادي صوديوم جلوتامات MSG حيث يبين مستويات حمض الجلوتاميك الحر في الأطعمة.

(٤) استخدام تحليل الأحماض الأمينية لمعرفة الأخطار من التمثيل الغذائي لها

أظهرت التقارير في القرن السابق عن وجود تمثيل غذائي غير سليم -Disorder راجع إلى الجينات وتبين أن العيوب في جين واحد أو الكروموزومات غير السليمة Abnormalities تقع في حدود ٨-١٠٪ في الأطفال. وأن حوالي ٥٪ من تعداد الأفراد الذين لهم عمر أقل من ٢٥ عاما لهم تمثيل غذائي للأحماض الأمينية غير سليم Metabolic disorder. وتستجيب بعض هذه الأمراض للعلاج إذا تم الكشف عنها مبكرا. وأمكن تشخيص ٥٠ مرض نتيجة التغيير في التمثيل الغذائي للأحماض الأمينية. ومن الأمراض الشائعة الفينيل كيتو يوريا Phenyl Keto Urea Histidinemia (زيادة تركيز لهستيدين في الدم)، Argininosuccinaciduria و Hyperphenylalaninemia. وأن تشخيص التمثيل الغذائي غير السليم ليس مهما فقط للحصول على العلاج المناسب ولكنه أيضا مهما لمنع انتقال هذه الصفة إلى الأطفال حيث أنه يوجد احتمالان مقدار ٢٥٪ للانتقال إلى الطفل.

(٥) منع المشاكل عند تجهيز الأطعمة Formulation problems

تحدث مشاكل كثيرة عند إعداد الطعام منها تلون الأطعمة بلون بني وهذا اللون يرجع عادة إلى وجود مجموعة الأمين البعيدة للحمض الأميني ليسين. وفي السنوات الأخيرة أصبحت هناك أهمية كبيرة لمعرفة نواتج التحليل المائي للبروتين وتقدير مجموعات الأمين (أحماض أمينية حرة + مجموعة الأمين الطرفية + مجموعة الأمين البعيدة لليسين) لما لها من مشاكل خطيرة في تصنيع الغذاء. تظهر نواتج تفاعل ميلارد Maillard اللونى مجموعة من المشاكل تتمثل في منع الهضم وإحداث طفرات ولذلك فإن منع تكوين هذا اللون في صناعة الأغذية أو في الأطعمة شيء مرغوب جدا.

(٦) اختبارات الجودة

تستخدم بعض الأحماض الأمينية ومشتقاتها كمواد مشجعة للرائحة مثل أحادي جلوتامات الصوديوم. وفي بعض الأحيان يكون مطلوب التدعيم بواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية لرفع القيمة الغذائية للبروتين. ومن أمثلة ذلك بروتين فول الصويا يجب تدعيمه بالمثيونين كما أنه يجب تدعيم بروتين الأرز بالليسين والثريونين.

(٧) موضوعات قانونية Legal issues

يجب أن تحتوى أغذية الأطفال على كميات مناسبة وجودة عالية من البروتين وهذا يتم بتقدير نوعية وكمية الأحماض الأمينية ونسبة كفاءة البروتين. وفي حالات كثيرة لابد من إضافة بعض الأحماض الأمينية الحرة لرفع القيمة الغذائية للبروتين. وعلى ذلك يلزم إما إجراء تحليلات بسيطة مثل التعرف الكامل على الأحماض الأمينية، كما توجد تحليلات أكثر تعقيداً تتمثل في تقدير الإتاحة الحيوية Bioavailability للأحماض الأمينية خاصة في الأطعمة التي تستخدم كمصدر وحيد للتغذية.

ويمكن استخدام تقدير مدى قابلية البروتين للهضم والمقياس الكيميائي للأحماض الأمينية كاختبارات لمعرفة جودة البروتين.

٣-١- وجود الأحماض الأمينية في الطعام:

توجد الأحماض الأمينية في صورتين وهما:-

١) الصورة الحرة Free form

توجد الأحماض الأمينية الحرة فى الأجزاء النباتية Plant materials وفى الثمار ومنتجاتها Fruit products وكذلك فى الطعام المتخمّر Fermented food.

٢) الصورة المرتبطة Bound form

حيث ترتبط الأحماض الأمينية بواسطة روابط ببتيدية كما هو الحال فى الببتيدات البسيطة والعديدة والبروتينات. وبصفة عامة يجرى تحليل للأحماض الأمينية فى المجالات التالية:

- ١- أبحاث البروتينات والببتيدات.
- ٢- تحليل الأغذية ومواد العلف.
- ٣- تحليل المشروبات الروحية وعصائر الفاكهة.
- ٤- تحليل السوائل الفسيولوجية.
- ٥- تحليل المستخلصات النباتية.
- ٦- تحليل البينات المتخمرة.
- ٧- تحليل الأمينات العديدة، أمينات الكاتيكول، نواتج التمثيل الغذائى للتريبتوفان.

رابعاً- تحليل الأحماض الأمينية في المنتجات الغذائية

٤-١- تحليل الأحماض الأمينية الحرة

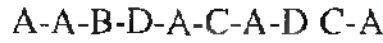
يلزم تحليل الأحماض الأمينية الحرة في نواتج التصنيع النهائية وأيضاً في العينات تحت التصنيع المعقدة نسبياً. وفي جميع الأحوال فإنه يلزم تحضير العينة لتقدير محتواها من الأحماض الأمينية الحرة.

وبصفة عامة يجب أن تكون العينة في صورة قابلة للاستخلاص، ففي حالة العينات السائلة وأغلب المساحيق فإنه يمكن استخلاص الأحماض الأمينية منها بكفاءة قبل التحضير، وفي حالة المواد الصلبة (منتجات اللحوم... الخ) فإنه يلزم تجنيس العينة أو تحويلها إلى صورة مسحوق (المواد الصلبة الجافة) للحصول على كفاءة استخلاص عالية.

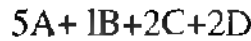
في حالة العينة الجاهزة للاستخلاص فإنه يجري رجها مع مذيب مناسب وهو القادر على ذوبان الأحماض الأمينية الحرة. ومع ذلك يظهر الليوسين والميسستئين مشاكل في الذوبان حيث يحتاجا إلى ظروف حمضية نسبياً. وهناك بعض الأحماض الأمينية مثل التريبتوفان ترتبط بقوة مع البروتينات في سيرم الدم ولبن الإنسان فيلزم في هذه الحالة فترات رج طويلة لذوبانها بالكامل. وتظهر هذه المشكلة في حالة المعامل الطبية حيث يجري تحليل الأحماض الأمينية الحرة للأغراض التشخيصية. ويستخدم بصفة خاصة مذيب واحد وهو حامض الهيدروكلوريك المخفف، حيث ترج العينة مع ١,٥ عيارى HCl لمدة لا تقل عن ١٥ دقيقة على درجة المعمل. ينبع ذلك ضبط درجة حموضة الوسط ثم تخفيف العينة قبل تحليل الأحماض الأمينية. ويجب منع تسخين العينة نظراً لوجود العديد من الأحماض الأمينية التي يتغير تركيبها في الظروف الحمضية عند درجات الحرارة العالية.

٢-٤- تحليل الأحماض الأمينية المرتبطة

يلزم عند تحليل الأطعمة معرفة التركيب العام للأحماض الأمينية الشائعة، وهذا يتطلب تحليل البروتينات والبيبتيدات تحليلًا مائيًا كاملاً لتكسير الروابط البيبتيدية التي تربط الأحماض الأمينية كما في الشكل التالي



تحليل مائي ↓



حيث A,B,C,D عبارة عن أحماض أمينية

وهناك العديد من المشاكل تحدث أثناء عملية التحليل المائي والتي تتضمن ما يلي:-

- ١- مشاكل الأحماض الأمينية التريتوفان السيستين والسستين، حيث ينكسر التريتوفان في وجود حمض قوي ساخن (خاصة في وجود الكريوهيدرات) وأيضاً يتأكسد كبريت السيستين والسستين.
- ٢- يحدث تكسير للسيرين والثريونين، حيث يحدث غالباً نزع الماء منهما.
- ٣- يحدث أثناء التحليل المائي تحليل الأميدات «الجلوتامين والأسباراجين» حيث تتحول إلى الأحماض المقابلة. وعلى ذلك، يقدر الجلوتامين والجلوتاميك على أساس جلوتامين كلي (GLX) والأسباراجين والأسبارتيك على أساس حمض اسبارتيك كلي (ASX)، أي الأحماض مع بعض.
- ٤- يوجد اختلاف في الثبات الكيميائي Chemical stability لعدد من الأحماض الأمينية مثل التريتوفان.

٥- يلاحظ أن الرابطة الببتيدية للحمضين الأمينيين اللبوسين والأيزوليوسين ثابتة ونحتاج إلى فترة تحليل مائي طويلة.

ولذلك فمن الضروري استخدام طرق أخرى بديله لتقدير هذه النوعية من الأحماض الأمينية. وتوجد طرق مباشرة لتقدير هذه الأحماض الأمينية فمنها:-

التحليل بالفلورة للتربتوفان وكذلك تفاعل الجواهر الكشاف

(2-nitrobenzoic acid (DTNB -dithiobis 5,5 مع السستين والسستئين. وهذه الطرق تقدر هذه الأحماض في البروتين مباشرة بدون إجراء التحليل المائي.

والجدول في صفحة (٤٢) يبين الطرق المتخصصة للتحليل المائي باستخدام حمض HCl 7 عيار على درجة ١٠٥ - ١٢٠ °م لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

وهذه الطريقة مناسبة لتقدير الأحماض الأمينية ألفا. وطرق التحليل المائي القاعدي (صودا كاوية، هيدروكسيد الليثيوم، هيدروكسيد الباريوم) على درجة ١٠٥ - ١٢٠ °م لمدة ١٨-٢٤ ساعة للتربتوفان، والأكسدة بواسطة حمض بيرفورميك ثم يتبعه تحليل مائي لتقدير السستئين والسستين (على أساس حمض السستيك). ويلاحظ أن ظروف التفاعل مثل رفع درجة الحرارة، استخدام الميكروويف وإضافة مادة مضادة للأكسدة تؤثر في عملية التحليل المائي.

وفيما يلي أسماء الأحماض الأمينية التي تنكسر أثناء التحليل المائي

جلوتامين

أسباراجين

تربتوفان

ثريونين

سيرين

سستين

ميثونين

بالإضافة الى الأحماض الأمينية سالفة الذكر يحدث أيضا فقد لبعض الأحماض الأمينية إذا أجريت أكسدة للعينة مع التحليل المائي وهي:

تيروزين

فينيل آلانين

هستيدين

أرجنين

اختيار طريقة التحليل المائي

نختار أحد الطرق التالية:

- تحليل مائي بواسطة حمض معدني .

- تحليل مائي بواسطة حمض عضوي .

- تحليل مائي بواسطة قلوي .

مع ملاحظة هل المطلوب:

أ - أكسدة العينة أثناء التحليل المائي .

ب- تقدير التريتوفان كميًا .

ج - إحتواء العينة على المركبات الكربوهيدراتية .

تجرى عملية التحليل المائي باستخدام انبوبة إختبار مغلقة Sealed أو تجرى

عملية التسخين تحت مكثف عاكس Reflux في الجو العادي .

ويجب ملاحظة أنه لا توجد طريقة تحليل مائي واحدة تعطي استرجاع كامل

لكل الأحماض الأمينية في العينة .

٤-٣- تحضير العينات والمعاملات التي تجري عليها

تشمل هذه المعاملات على الترشيح، والتركيز معتمداً على خصائص العينة وفي الترشيح يمكن استخدام ورق الترشيح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر و المرشحات الزجاجية لمنع مرور المركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة ثم نترك لترشح بواسطة الجاذبية الأرضية، ولأسراع عملية الترشيح يجرى لها طرد مركزي. وفي تقديرات الأحماض الأمينية الحرة فإنه يلزم التخلص من البروتين قبل التحليل المائي باستخدام حمض سلفوساليسيليك أو حمض بيركلوريك أو حمض ثلاثي كلوروكليك أو تنجستات صوديوم أو يرانيل حمض خليك أو استخدام مذيبيات عضوية مثل أسيتو نتريل ثم يعقب ذلك الترشيح للتخلص من البروتين الراسب وأفضل جوهر كشاف هو حمض سلفوساليسيليك (SSA). وفيما يلي الخطوات المتبعة لترسيب البروتين هي:

١ مل عينة + ٥٠ مجم SSA في أنبوبة اختبار

↓ رج

تترك لمدة ساعة على درجة ٤ ° م

↓

طرد مركزي لمدة ١٥ دقيقة على ٥٠٠٠ لفة/دقيقة

↓

ترشيح الجزء الرائق من خلال ورق ترشيح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر

والطرق الأخرى التي تعمل على التركيز وإزالة الشوائب & Concentration clean up تشمل استخدام أعمدة قصيرة (Sep pak) والمواد المعبأة تشمل Rexyn 101 (H), Amberlite IR 120، وتعمل هذه المواد على ارتباط الأحماض الأمينية بمتبادل كاتيوني قوى ثم الاستخلاص بواسطة قاعدة متطايرة

(أمونيا). ويجرى تبخير المذيب للحصول على الأحماض الأمينية الحرة. وفي حالة العينات الغنية بالدهون، فانه يلزم استخلاصها باستخدام هكسان أو أسيتون/كلوروفورم (١:٣). وبصفة عامة يجب التأكد من تمام استعادة وثبات الأحماض الأمينية. ولهذا يجب إجراء معايرة داخلية أو خارجية لمعرفة مدى الاستعادة Recovery، يلاحظ أنه كلما زادت الخطوات العملية زاد الخطأ التجريبي. وفيما يلي ملخص للخطوات اللازمة إجرائها قبل التقدير الكمي للأحماض الأمينية.

أولا- الأحماض الأمينية الحرة Free amino acids

(١) السوائل Liquids

تجرى عملية تحفيف السوائل بالمحلول المنظم Loading or injection buffer ويعقبها ترسيب البروتينات ثم الترشيح من خلال مرشح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقى Ultracentrifugation

(٢) المواد الصلبة والمساحيق Solid and powder materials

تجرى الخطوات التالية:- تجفيف- تجانس- استخلاص بواسطة ١,٠ مولر HCl أو ميثانول (٧٠٪)- التركيز باستخدام جهاز Rotar evaporator على درجة حرارة لا تتعدى ٤٠ °م- الذوبان في محلول منظم -Injection or load- ing) يعقبه الترشيح الفوقى Ultrafiltration

ثانيا- الأحماض الأمينية الكلية Total amino acids

تشمل الأحماض الأمينية الحرة والمرتبطة بعد تحليلها مائيا، حيث يجرى التحليل المائي إما باستخدام حمض عضوى أو غير عضوى أو قلوئى- ويجب

الأخذ في الاعتبار عند إختيار الطريقة المناسبة للتحليل المائي هل يلزم أكسدة للعينة قبل التحليل المائي- هل المطلوب تقدير التريتوفان كميًا- هل العينة تحتوي على كربوهيدرات. ويجرى التحليل المائي للعينة إما في أنبوبة مغلقة sealed ومفرغة باستخدام ٦ مولر حمض HCl والتسخين على درجة ١١٥°م. وفيما يلي بعض الطرق المستخدمة في التحليل المائي للبروتين:

١- التحليل المائي القلوي Alkaline hydrolysis

تؤخذ وزنة (١-٥ مجم) بروتين وتحلل مائياً بواسطة ٠,٥ سم^٣ NaOH (٥ع) أو Ba (OH)₂ يحتوى على ٢٥ مجم نشا (مادة مضادة للأكسدة)- يلاحظ أن نسبة استرجاع التريتوفان هي ١٠٠٪ ولكنها غير مناسبة لأغلب الأحماض الأمينية.

٢- حمض ثيوجليكوليك Thioglycolic acid

تؤخذ وزنة (١,١-٠,٢ مجم) بروتين ويحلل مائياً بواسطة ٣ مل حمض HCl (٦ع) يحتوى على ٢٪ حمض ثيوجليكوليك- يلاحظ أن نسبة إسترجاع التريتوفان هي ٨٥٪.

٣ حمض باراتولين سلفونيك P-Toluene sulfonic acid

تؤخذ وزنة (٢-٣ مجم) بروتين ويحلل مائياً بواسطة ١ مل حمض باراتولين سلفونيك (٣ع) يحتوى على ٠,٢٪ تريتامين Tryptamine- يلاحظ أن نسبة إسترجاع التريتوفان هي ٩٤٪ في غياب المواد الكربوهيدراتية، ٧٢٪ في وجود ٣٠٪ كربوهيدرات في العينة.

٤- حمض مركاتوبوايثان سلفونيك Mercapto ethane sulphonic acid

تؤخذ وزنة (٠,٥ - ٢ مجم) بروتين وتحلل مائياً بواسطة ١ مل حمض مركاتوبوايثان سلفونيك (٣ع) - نسبة إسترجاع التريتوفان بهذه الطريقة هي ٩٥٪. بالاضافة إلى ذلك يطبق التحليل المائي بالانزيمات لتقدير الجلوتامين والأسباراجين.

ويجب التنويه مرة أخرى الى أن الأحماض الأمينية التي يحدث لها تكسير أثناء عملية التحليل المائي هي: جلوتامين، أسباراجين، تريتوفان، ثريونين، سيرين، سستين، ميثيونين. ويحدث فقد في كمية الأحماض الأمينية التالية عند أكسدة العينة قبل التحليل المائي: تيروسين، فينيل آلانين، هستدين، أرجنين. والجدير بالذكر أنه لا توجد طريقة واحدة تعطى إسترجاع كامل لكل الأحماض الأمينية.

٤-٤ طرق التحليل المائي للأغذية ومواد العلف Food and feedstuff

١- تجرى عملية أكسدة قبل التحليل المائي للعينة - ويحضر مخلوط الأكسدة كما يلي:

٠,٥ مل فوق أكسيد الأيدروجين (٣٠٪) + ٤,٥ مل حمض فورميك (٨٨٪) + ٢٥ مجم فينول.

يحضن الخليط على درجة ٣٠°م لمدة نصف ساعة ثم يبرد على درجة الصفر المئوي لمدة ١٥ دقيقة.

٢- يجرى طحن للعينة (٠,١ - ١ جم) طحناً دقيقاً ثم تبرد الى درجة الصفر المئوي.

بعض الطرق القياسية الشائعة للتحليل المائي للبروتينات

	ظروف التحليل المائي	ظروف التحليل المائي	ملاحظات
1	6 N HCl (with or without protectant, e.g., 2% thioglycolic acid)	16 72 hrs, 110°C 4 hrs, 145-155°C microwave (minutes)	يجرى تحليل مائي لعشرات مختلفة لتعدد الوقت الكافي لإتمام التحليل المائي - وأن وقت واحد فقط للتحليل المائي يكون غير مناسب - الهضم بأشعة الميكروويف يكون أسرع وهذه الطريقة غير مكلفة.
2	6N HC (with tryptamine)	22 hrs, 110°C	تجرى هذه الطريقة لتقدير مدى إسترجاع التريتوفان
3	4 N methanesulfonic acid (with or without protectant, e.g., 3- (2- aminoethyl) indole	22- 24 hr, 115°C	حساسة للكربوهيدرات- لابد من تقنية clean up الببتيدات والبروتينات قبل تطبيق هذه الطريقة على الأطعمة. يحدث فقد قليل في الببتيدات والأحماض الأمينية الحرة عند التخلص من الكربوهيدرات في المينة.
4	Propionic + hydrochloric acid	50/50 v/v	تستخدم في تحليل الببتيدات المرتبطة مع الراتنجات resin
5	3 Np-Toluenesulfonic acid	22hr, 110°C	لا تستخدم في التحليل المائي للأطعمة.
			طريقة أخرى للتحليل المائي بديلة عن استخدام حمض HCl محاولة للحصول على التريتوفان والسمتين بعملية تحليل مائي واحدة مرتفعة الزمن عند استخدامها في التحليل المائي للأطعمة.
6	3 N mercaptoethanesulfonic acid	22hr, 110°C	مثل ملاحظات الطريقة الخامسة.

تجرى هذه الطرق في جو خامل أو مفرغ من الهواء

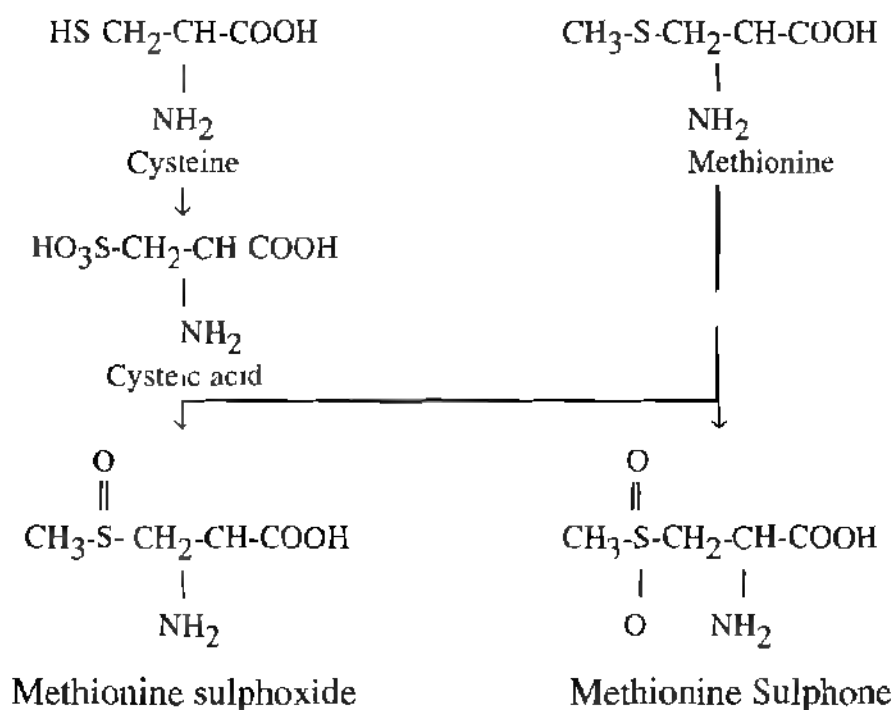
٣- يضاف مخلوط الأكسدة الى العينة مع الرج ثم يبرد الخليط الى درجة الصفر المئوى لمدة ١٦ ساعة.

٤- يضاف ٠,٨٥ جم ثنائى كبريتات الصوديوم Sodium disulfate ثم يرج.

٥- يجرى تحليل مائى للعينة باستخدام ٥٠ مل حمض HCl (٦ ع) يحتوى على ٥٠ مجم فينول تحت مكثف عاكس على درجة حرارة ١١٠°م لمدة ٢٤ ساعة.

٦- تصبى درجة حرارة حموضة الوسط الى ٢,٢ باستخدام محلول صودا كاوية (٧,٥ ع) ويرشح ناتج التحليل المائى من خلال مرشح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر.

يلاحظ : فى هذه الطريقة تحول الأحماض الأمينية سستئين- ميثيونين إلى حمض سستيك Cysteic acid ومثيونين سلفون ومثيونين سلفواكسيد على التوالى:



والجدير بالذكر إن أنواع العينات التي يجرى لها تحليل مائى لمعرفة نوعية الأحماض الأمينية بصفة عامة تتضمن ما يلى:

أ- مصادر بروتينية نقية:

تشمل كل من الشعر (كيراتين) - الجلد (كولاجين - الإستين) - بروتينات محضرة بواسطة الهندسة الوراثية .

ب - الحبوب ومواد العلف:

وهى تحتوى على نسبة منخفضة نسبيا من البروتين ونسب مختلفة من المواد الكربوهيدراتية .

ج - النباتات والفطريات:

تحتوى على مدى واسع من الأحماض الأمينية مع كميات متفاوتة من البروتين .

د - الصخور والحفريات Fossils

حيث يظهر تحليل الأحماض الأمينية علاقة بعمر الصخور المتحولة - Meta-morphic rocks

خامساً: تقدير الأحماض الأمينية في الطعام والأعلاف

أولاً: الطرق الوصفية ونصف الكمية Qualitative & semiquantitative لتقدير الأحماض الأمينية:

تشمل هذه الطرق ما يلي:

أ - الكروماتوجرافى الورقى Paper chromatography

ب - كروماتوجرافى الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography

ج - طرق الهجرة فى المجال الكهربى Electrophoretic technique

د - طرق كيميائية بتكوين مشتقات للأحماض الأمينية.

٥-١ طرق الكشف عن الأحماض الأمينية (اللونية-الفلورية)

يوجد نوعان من الطرق الكيميائية للكشف عن الأحماض الأمينية وهما:
الطرق اللونية وطرق الوميض (الفلورية).

أولاً: الطرق اللونية:

تشمل هذه الطرق تفاعل الجواهر الكشاف باولى Diazotized sulphanilic acid (Pauly) مع الهستدين، التيروزين ويعطى ناتج ذو لون أحمر ويحدث هذا التفاعل أيضاً مع المركبات الفينولية الأخرى- يتفاعل الجواهر الكشاف إيرليش P-amino benzaldehyde (Ehrlich) فى حمض HCl مع التريتوفان وبعض الأندولات الأخرى ويعطى لون أزرق محمر، بينما يعطى هذا التفاعل لون أصفر مع الأمينات العطرية ومركبات اليوريا Ureides ولهذا يجب التخلص أولاً من اليوريا الموجودة فى أغلب السوائل الحيوية.

ترجع أهمية الجواهر الكشافة سالفة الذكر فى تحديد أماكن الأحماض الأمينية المفصولة بواسطة طرق التحليل الكهربى وكذلك التحليل ذو الطبقة الرقيقة TLC.

يبين الجدول التالي الجواهر الكشفية المتخصصة في التعرف على أحماض أمينية معينة.

ملاحظات	اللون الناتج	الأحماض الأمينية	التركيب وظروف التفاعل	الجواهر الكشف
غير متخصص - أساسي للكشف عن البرولين	أزرق غامق أزرق/أخضر أزرق خفيف بنّي خفيف رمادي/أزرق	برولين هيدروكسي برولين أسبارتيك جلوتاميك الأنين فينيل آلانين تيروزين بيتا آلانين جلوتامين تريوفان سيتروالين	٢ جم إيزاتين / لتر أسيدون - المسخن على درجة ١٠٠ م لمدة ٢-٣ دقيقة	إيزاتين Isatin
يتفاعل مع بعض الاندولات والأمينات العطرية	أزرق فاتح أحمر فاتح قرنفل/أحمر أصفر		١٠٠ جم بارا ثنائي ميثايل أمينو بنزالدهيد / لتر حمض HCl مركز بخلط حجم واحد منه مع ٤ حجم أسيتون - يتم التفاعل في خلال ٢٠ دقيقة.	Ehrlich

(تابع) جدول الجواهر الكشفية المتخصصة فى التعرف على أحماض أمينية معينة.

بنفساجل مع بعض الايبيدارولينات والمركبات الفينولية وأملاح الأمونيوم	أحمر برتقالى فاتح	هستين تيروزين	٩ جم حمض سلفانيليك/ لتر حمض HCl مركز- يخلط حجم واحد منه مع ١٠ حجوم ماء، حجم واحد من نيتريت صوديوم (٥٠ جم/ لتر)، حجم واحد من كربونات صوديوم (١٠٠ جم/ لتر)	ثنائى الأسيتيل Diacetyl	باولي Pauly
	بنفسجى / أحمر	ارجنين	١٠٠ جم ألفا نافلول/ لتر صودا كاوية (٨٠ جم/ لتر) + حجم مساو من ثنائى الأسيتيل (١ مل/ لتر ماء) يخلط قبل الاستخدام- يسخن على درجة ١٠٠ م لمدة ٢-٣ دقائق.		
تختفى الألوان بعد حوالى ٣٠ دقيقة	بنفسجى بنفسجى بنفسجى بنفسجى	سستين سستين هوموسستين هوموسستين	تعتصر المحاليل التالية بمعدل (١٠٠ جم/ لتر) صودا كاوية- نيتروبروسيد الصوديوم- حديدى سيانيد البوتاسيوم. يخلط حجم واحد من كل محلول سبق تحضيره بعد تخمينه ٣ مرات بالماء وتترك لمدة ٣٠ دقيقة قبل الاستخدام - لا يحتاج التفاعل لتسخين.	السيانيد Cyanide nitro prusside	نيتروبروسيد

ثانياً: الطرق الفلورية

تفوق هذه الطرق في حساسيتها وتخصصها على الطرق اللونية وفيما يلي الطرق الفلورية التي تستخدم في التقديرات الكمية للأحماض الأمينية العطرية: تيروسين والفينيل ألانين

١- التيروسين

يتفاعل جوهر ١- نيتروزو ٢- نافثول Nitrozo-2- naphthol 1- مع التيروسين في وجود نيتريت الصوديوم ليعطى مركب أحمر غير ثابت والذي يتحول بالتسخين في وجود حمض النيتريك ليعطى مركب فلوري أصفر ثابت. وبعد التخلص من زيادة الجوهر الكشاف نيتروزونافثول يقدر المركب المفلور عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر. وفيما يلي خطوات إجراء هذا التفاعل:

الجواهر الكشافة

- ١-١ - نيتروزو - ٢ - نافثول (٢ جم / لتر إيثانول ٩٥ %) ٢ حجم.
 - ٢ - حمض نيتريك (٣ مول / لتر) ٣ حجم.
 - ٣ - نيتريت صوديوم (١, ٠ مول / لتر) ٣ حجم.
- تخلط هذه المكونات قبل الاستخدام مباشرة.

الطريقة:

- ١ - يخلط ١٠ ميكرو لتر من العينة مع ٢٠٠ ميكرو لتر من الجوهر الكشاف نيتروزونافثول ويسخن على درجة ٣٣° م لمدة ٢٠ دقيقة.
- ٢ - يضاف ١ مل ماء و ٣ مل ثنائي كلوريد الإيثيلين ويخلط ثم يجرى طرد مركزي.

٣- تزال الطبقة المائية العلوية ثم يترك ليحدث التفاعل على درجة حرارة الغرفة لمدة ٤٠ دقيقة.

٤- تقدر الفلورة في خلال ٣٠ دقيقة عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر بعد التهيج عند طول موجة ٤٦٠ نانومتر.

٢- الفيناييل آلانين

يتفاعل الفيناييل آلانين مع الننهيدرين في وجود بيبتيد ثنائي (عادة جليسيل-ليوسين أوليوسيل-آلانين) ليعطى مركب مفلور. ويمكن اسراع وتثبيت الفلورة بإضافة محلول نحاس قلوي لضبط درجة حموضة الوسط (pH) الى ٥,٨ ويقدر المركب المفلور عند طول موجة انبعاث ٥١٥ نانومتر بعد الإثارة على طول موجة ٣٦٥ نانومتر.

الجواهر الكشافة

١- محلول منظم سكسينات Succinate buffer (٠,٣ مول / لتر) ذو درجة حموضة (pH) ٥,٨.

٢- ننهيدرين (٣٠ ملليمول / لتر).

٣- ليوسيل-آلانين (٥ ملليمول / لتر) أو جليسيل-ليوسين.

٤- جواهر النحاس:

كربونات صوديوم (١,٦ جم / لتر) - طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (٦٥ جم / لتر) - كبريتات نحاس (٦٠ مجم / لتر).

الطريقة:

- ١- يسخن ٢٠ ميكرو لتر عينة + ٢٠ ميكرو لتر محلول منظم سكسينات + ٨٠ ميكرو لتر نزهيدرين + ٤٠ ميكرو لتر محلول ببتيد ثنائي على درجة ٦٠° م لمدة ٢ ساعة ثم يبرد الى درجة ٢٠° م.
- ٢- يضاف ٢ مل من جوهر النحاس- تقدر الفلورة عند طول موجة انبعاث ٥١٥ نانومتر وإثارة على طول موجة ٣٦٥ نانومتر.

ثانياً: الطرق الكمية Quantitative

وتشمل الطرق التالية:

التحليل الكروماتوجرافي الغازي GLC- التحليل الكروماتوجرافي السائلي.

وقد تم التعرض الى هذه الطرق التحليلية في كتاب «التحليل الكروماتوجرافي» لنفس المؤلف. وفي هذا الجزء تم اضافة الادمصاص الأيوني وهي من الطرق الشائعة لتحليل الأحماض الأمينية. وفيما يلي أهم الطرق المستخدمة في تحليل الأحماض الأمينية.

٥-٢- التقدير الكمي باستخدام التحليل الكروماتوجرافي الغازي

Gas-liquid chromatography

توجد صعوبات عند تحليل الأحماض الأمينية بواسطة الـ GLC حيث أن الأحماض الأمينية عبارة عن مركبات كيميائية غير متجاسة وليست متطايرة بالقدر الكافي. ويلزم تحويلها الى مشتقات متطايرة وقد تتكون مشتقات مختلفة بالنسبة للحمض الأميني الواحد (أحادية وثنائية المشتقات) وبالتبعية لا تعطى مقدار كمي لكل حمض أميني بالاضافة الى صعوبة تكوين هذه المشتقات وتأخذ

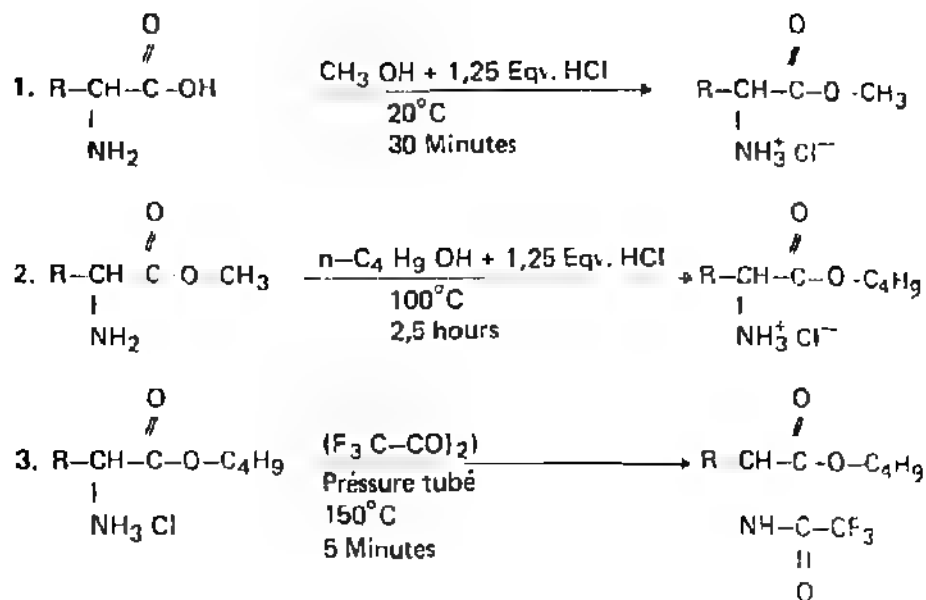
وقتنا طويلا للحصول عليها. والصعوبات في الفصل لا ترجع فقط الى اختيار الطريقة لتكوين مشتقات بل ترجع أيضا الى اختيار الطور الثابت القادر على فصل مشتقات الأحماض الأمينية ذات التركيب الكيميائي المتشعب Diverse group of compounds. وأيضا من ضمن المشاكل في فصل الأحماض الأمينية هو اختيار الكاشف Detector المناسب حيث عادة ما يستخدم كاشف (FID) الغير متخصص.

وفيما يلي مشتقات الأحماض الأمينية المناسبة للفصل الكروماتوجرافي الغازي.

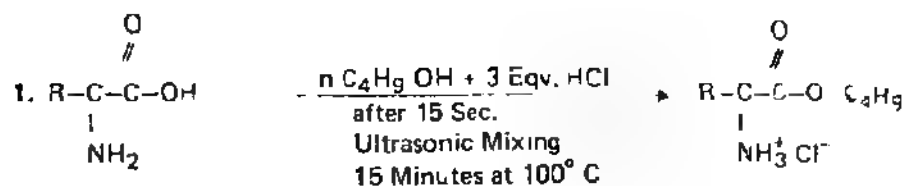
المشتق	الرمز
N TMS-TMS-ester	TMS-NCHR COO-TMS
N-TMS-n butyl ester	TMS-NH-CHR COOC ₄ H ₉
TFA-n-butyl ester	CF ₃ -CO-NH-CHR-COOC ₄ H ₉
HFB-n-propyl ester	C ₃ F ₇ CO-NH CHR-COOC ₃ H ₇

وتمتاز طريقة تكوين المشتقات TMS بسهولة اجراء الطريقة، حيث يضاف المركب Bistrimethyl silyl (trifluoro acetamide) في الأسيتو نتريل والتسخين لمدة ساعتين على درجة ١٥٠° م في ظروف جافة في أنبوبة مغلقة Sealed tube. ومن الطرق الشائعة هو تكوين استرات البيوتاييل للحمض الأميني ويعقبه TMS. أو مشتقات ثلاثي فلوروأسيتيل TEA أو سباعي فلورو بيوتاييل HFB لمجموعة الأمين بالتفاعل مع TAF أو HFA في ثنائي كلوريد الميثيلين على التوالي لمدة ٥ دقائق على درجة ١٥٠° م. واستخدمت بكثرة المشتقات n-HFB propylesters في معرفة نوعية الأحماض الأمينية في الأجهزة التي

Esterification and Trifluoroacetylation of Amino Acids



b)



تستخدم أعمدة شعرية وكاشف electron capture وكذلك حالة تحويل الأحماض الأمينية الى مركبات متطايرة كحولية في وسط حمضي لتكوين استر ويعقب ذلك اجراء أسئلة لمجموعة الأمين باستخدام عديد من أندريدات الأحماض (أنظر صفحة ٥٣).

والجدول التالي يبين الجواهر المختلفة المستخدمة لتكوين مشتقات الأحماض الأمينية.

الجواهر للكشف لتكوين استر	الجواهر للكشف لأسئلة الأمين
3N HCl/iso - propanol or isobutanol	N-methyl-N-(tert-butyl dimethyl silyl) trifluoroacetamide-
3N HCl/Normal butanol	- Pentafluoropropionic anhydride
3N HCl/Normal propanol	- Trifluoroacetic anhydride
3N HCl/Methanol	-Heptafluorobutyric anhydride
3N HCl/Iso amyl alcohol	

٥-٣- مشتقات الأحماض الأمينية للفصل الكروماتوجرافي السائلي HPLC

يلاحظ أن الأحماض الأمينية العطرية تمتص الأشعة في منطقة الـ UV (٢٥٠-٢٨٠ nm)، وأن التربتوفان له خواص الفلورة (تهيج عند ٢٩٥ nm وانبعاث عند ٣٤٥ nm) إلا أن غالبية الأحماض الأمينية ليس لها امتصاص أو فلورة أو لها تفاعلات كيميائية مميزة. بالإضافة إلى ذلك، فإنها غير متطايرة بدرجة كافية لتحليلها بواسطة GC، ولذلك لابد من عمل مشتقات لتحقيق هدفين:-

- ١- سهولة الكشف عنها (إدخال كروموفور أو فلوروفور).
- ٢- تحويل الأحماض الأمينية الى مشتقات متطايرة.

تكوين مشتقات سهل الكشف عنها

تستخدم هذه الطريقة بصفة أساسية عند فصل الأحماض الأمينية والكشف عنها بواسطة HPLC. وتوجد ثلاثة أنواع أساسية من الكواشف للكشف عن الأحماض الأمينية وهي كاشف الأشعة فوق البنفسجية والضوء المرئي (V.UV) وكاشف الفلورة والكاشف الكهروكيميائي electrochemical.

والكواشف التي تعتمد على الامتصاص والفلورة هي الشائعة والأكثر شيوعاً هو الكاشف UV.

المشتقات التي تستخدم في طريقة Post column

١-٣-٥- الننهيدرين (Nin) Ninhydrin

وهو من الجواهر الكشافة الهامة والتي تكون كروموفور بنفسجي Purple chromophore مع الأحماض الأمينية الأولية ويعطى كروموفور أصفر مع الأحماض الأمينية الثانية Secondary وهي البرولين والهيدروكسي برولين.

وبحدث الامتصاص للكروموفورات عند أطوال موجية ٥٧٠ نانومتر (أولية) و٤٤٠ نانومتر (ثانية). وتصل حساسية هذا التفاعل إلى ١٠ بيكومول لأي حمض أميني وهو مناسب في التحليلات الروتينية.

والتفاعل يشمل الخطوات التالية:-

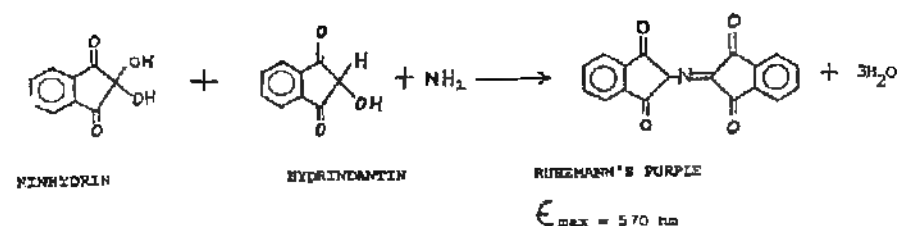
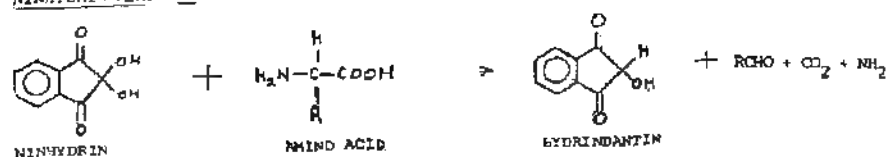
١ أكسدة مصحوبة بفقد مجموعة الكربوكسيل للحمض الأميني وإنتاج ننهيدرين مختزل وأمونيا وثاني أكسيد كربون.

٢- يتفاعل الننهيدرين المختزل مع الننهيدرين والأمونيا الناتجة.

٣- يتكون معقد لوني أزرق.

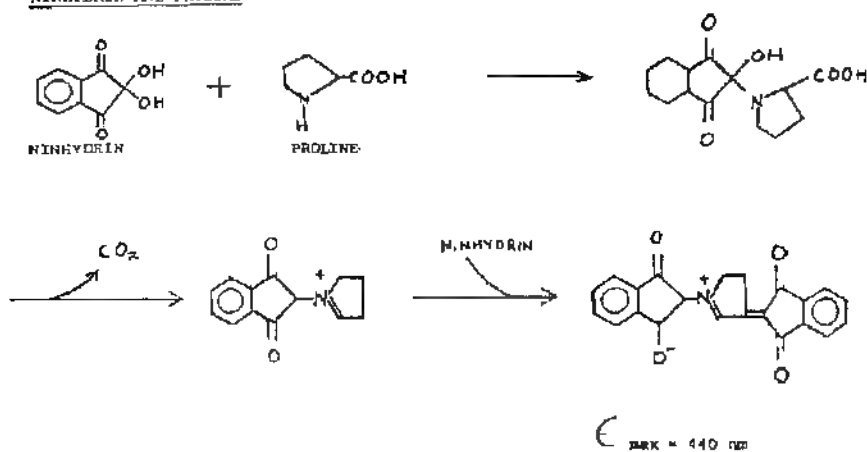
أولاً: تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية الأولى

NINHYDRIN REACTION



ثانياً: تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية الثنائية

NINHYDRIN AND PROLINE



يتفاعل الحمض الأميني مع النيهيدرين (Triketohydrindene hydrate) بالتسخين في وسط حمضي (درجة حموضة "pH" 3-4) وينتج أمونيا وثاني أكسيد كربون ومعقد ذو لون بنفسجي. وعادة يتكون جوهر كشاف النيهيدرين من نيهيدرين (2,5 جم) و 2,4,6-collodine (37 مل) وإيثانول (1750 مل) وحمض خليك ثلجي (37 مل). وبصفة عامة يتكون الجوهر الكشاف النيهيدرين مما يلي:

- ١- المذيب: إيثلين جليكول أو ثنائي ميثايل سلفوكسيد أو ميثايل سيللوسولف.
- ٢- المحلول المنظم: خلات الصوديوم أو البوتاسيوم تختلف في درجة الحموضة والتركيز.
- ٣- مسحوق النيهيدرين.
- ٤ - مادة مختزلة: ثلاثي كلوريد التيتانيوم أو كلوريد القصدير أو هيدرناتين.

ويستخدم هذا التفاعل في التقدير الكمي للأحماض الأمينية. تعطى الأمينات والأحماض الأمينية غير الألفا تفاعل لوني مع النيهيدرين بدون إنتاج CO_2 ، وعلى ذلك تتفاعل الأحماض الأمينية بيتا، جاما، دلتا، إيسيلون والبيتيدات ببطء بالمقارنة مع الأحماض الأمينية الألفا وتعطي معقد ذو لون أزرق، بينما تتفاعل الأحماض الإيمينو ويتكون معقد ذو لون أصفر يمكن تقديره عند طول موجة 440 نانومتر.

والجدول التالي يبين لون المعقد الناتج مع الأحماض الأمينية المختلفة:

لون المعقد	الحمض الأميني
بنى	هستيدين
بنى / رمادى	فينايل آلانين
أزرق	جليسين
أزرق واضح	جلوتاميك
رمادى / أزرق	ليسين
رمادى	تيروزين
برتقالى	برولين
برتقالى	هيدروكسى برولين
برتقالى / أصفر	أسبارتيك

٥-٣-٢- أورتو فيثالدهيد (OPA) Ortho- phthaldehyde

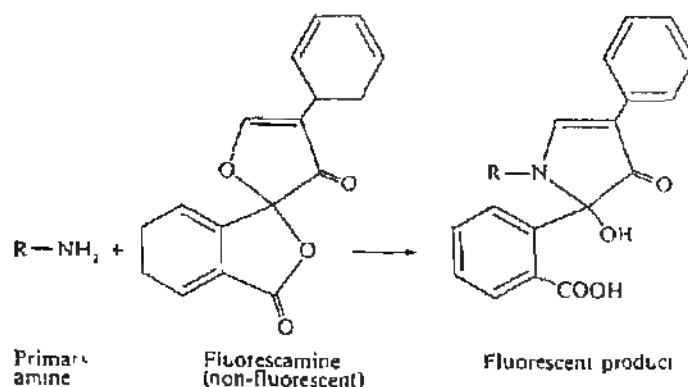
وهو الجواهر الكشاف الثانى الشائع الإستخدام. ويمكن استخدامه فى كل الطريقتين Pre-colum و Post-colum، وفيه تتفاعل مجموعة الثيول Thiol مع الأحماض الأمينية الأولية فى وجود مادة مختزلة قوية (mercapto etha- nol 2-) على درجة حموضة (pH) ٩-١١ وتعطى مركب مفلور (أقصى طول موجة تهبج ٣٤٠ nm وأقصى طول موجة انبعاث ٤٥٥ nm) ولهذا فإنه يعتبر مناسب جداً فى الفصل فى الـ post-column.

بالإضافة إلى ذلك، فهو أكثر حساسية بالمقارنة بالننهيدرين. ووجد نظرياً أن حساسيته تساوى ١٠٠ مرة ولكن من الناحية العملية Practical يحدث انخفاض فى الحساسية. ومن أهم عيوب هذا الجواهر الكشاف أنه لا يتفاعل مع البرولين والهيدروكسى برولين ولاجزء التفاعل يلزم أولاً التفاعل مع مادة مؤكسدة مناسبة مثل كلورامين- ت (Sodium N-chloro- P-toluene-sulfon amide)

$$\begin{array}{c}
 \text{CHO} \\
 | \\
 \text{C}_6\text{H}_4 \\
 | \\
 \text{CHO}
 \end{array}
 + \text{R-NH}_2 + \text{R'-SH} \xrightarrow[0.1-1 \text{ min}]{\text{Rm. temp}}
 \begin{array}{c}
 \text{S-R'} \\
 | \\
 \text{C}_6\text{H}_3 \\
 | \\
 \text{N-R}
 \end{array}
 + 2 \text{H}_2\text{O}$$

OPA p-amine Thiol Isoindole
Ex 230 or 340 nm
Em 410 - 700 nm

تتفاعل جميع الأمينات الأولية مع فلوروسكامين في وسط قلوي (درجة حموضة "pH 9-11") لتكوين مركب مفلور (أقصى طول موجة نهيج ٣٩٠ nm وأقصى طول موجة انبعاث ٤٧٥ nm) والمادة المفلورة غير ثابتة في الوسط المائي، ولذلك يجب أن يحضر الجوهـر الكشاف في الأسيتون. لا تتفاعل الأمينات الثنائية والبرولين والهيدروكسي برولين مع الجوهـر الكشاف إلا في حالة تحولها إلى أمينات أولية بالتفاعل مع N-Chloro-succinimide. ويمتاز هذا التفاعل بأنه يحدث بسرعة مع الأحماض الأمينية على درجة حرارة الغرفة ولكن حساسيته ليست أعلى من النيهيدرين.



٤-٣-٥ فلوروثنائي نيتروبنزين (FDNB) Fluoro- 2,4- dinitrobenzene

يتفاعل هذا الجوهر الكشاف في محلول قلوي (درجة حموضة ٩,٥) مع مجموعة أمين حرة أو حمض أميني أو ببتيدي ليتكون مشتق ثنائي نيتروفيثيل (DNP) أصفر اللون. ولا يستخدم هذا التفاعل في تقدير الأحماض الأمينية كمياً لأن أقصى امتصاص لمشتقات ثنائي نيتروفيثيل يختلف باختلاف نوعية الحمض الأميني، ولذلك تستخدم فقط في التحليل الوصفي عن طريق مقارنة R_F للأحماض الأمينية القياسية مع الأحماض الأمينية بالعينة بعد فصلها بواسطة التحليل الكروماتوجرافي الورقي وذو الطبقة الرقيقة.

تفاعل فلوروثنائي نيتروبنزين FDNB

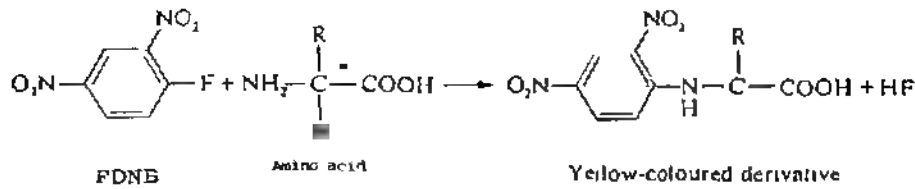
الجوهر الكشاف: محلول FDNB (٠,٢٥ مل) وكحول إيثايل مطلق (٤,٧٥ مل).

الطريقة: وزن العينة (٢ مجم) + ماء مقطر (٠,٢ مل) + محلول بيكرونات صوديوم (٤٢ جم / لتر - ٠,٠٥ مل) + الجوهر الكشاف (٠,٤ مل).

بعد، لرج يترك التفاعل لمدة ساعة. ويجب أن يظل الوسط قاعدي (pH = 8-9) وذلك بإضافة محلول بيكربونات الصوديوم.

يضاف ماء مقطر (١ مل) ومحلول بيكربونات صوديوم (٤٢ جم/ لتر- ٠,٠٥ مل).

يستخلص المستحلب ثلاث مرات بحجوم متساوية بالإثير للتخلص من الجوهر الكشاف الزائد. يضبط درجة حموضة وسط التفاعل (pH = 9) باستخدام HCl (٦ مول/ لتر) ثم يستخلص المشتق من المحلول بالإثير ٣ مرات، ٢ مل كل مرة. تجمع المستخلصات وتبخر للجفاف ثم يذاب المتبقى في ٠,٥ مل أسيتون ويستخدم للفصل بالطرق الكروماتوجرافية.



فيما يلي الجواهر شائعة الاستخدام في طريقة Pre-column

١ أورثوفينالدهيد OPA

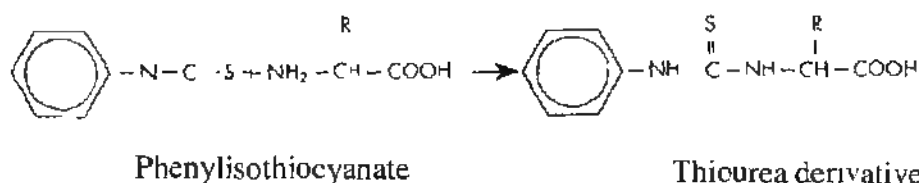
سبق أن تحدثنا عنه في نظام Post-column وعيوب استخدامه.

٥-٣-٥ فينيل أيزوثيوسيانات (PITC) Pheny Iso Thio Cyanate

يطلق على هذا الجوهر الكشاف جوهر Edman إدمان والذي يستخدم في معرفة تتابع الأحماض الأمينية في الببتيدات والبروتينات. ويعطى عند تفاعله مع الأحماض الأمينية في الببتيدات والبروتينات والأحماض الأمينية الحرة

مشتقات تسمى Phenyl Thio Carbamyl (PTC) ومن أهم عيوب هذا الجوهر:-

- ١- احتمال تكوين مشتقات مختلفة مع الليسين.
 - ٢- حساسيته منخفضة مع السستين.
 - ٣- حساس للماء والأملاح.
 - ٤ - يتأثر التفاعل بالمواد المصاحبة مع العينة (أمويا- سكرات).
 - ٥- لابد من خطوة الاستخلاص.
 - ٦- تحتاج لوقت طويل لإجراء المشتق مع مهارة في العمل.
- يجرى الكشف في منطقة الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي ٢٤٥ نانوميتر وحساسيته أفضل من التفاعل مع الننهيدرين.



٥-٣-٦- فينايل ثيوهيدانتوين (PTH) Phenyl Thio Hydantoin

وهذا التفاعل له نفس العيوب كما في حالة تكوين مشتقات PITC بالإضافة إلى عدم ثبات مشتقات الثريونين والسيرين. ويتم الكشف عن هذه المشتقات في منطقة الأشعة فوق البنفسجية. يمكن تحويل مشتقات فينايل ثيوكارباميل للأحماض الأمينية إلى التركيب الحلقى فينايل ثيوهيدانتوين. وحساسية هذا التفاعل أقل بمقدار ٥ مرات عن الننهيدرين.

٧-٣-٥- فلورينيل ميثوكسي كاربونيل كلوريد

Fluorenyl Methoxy Carbonyl Chloride (FMCC)

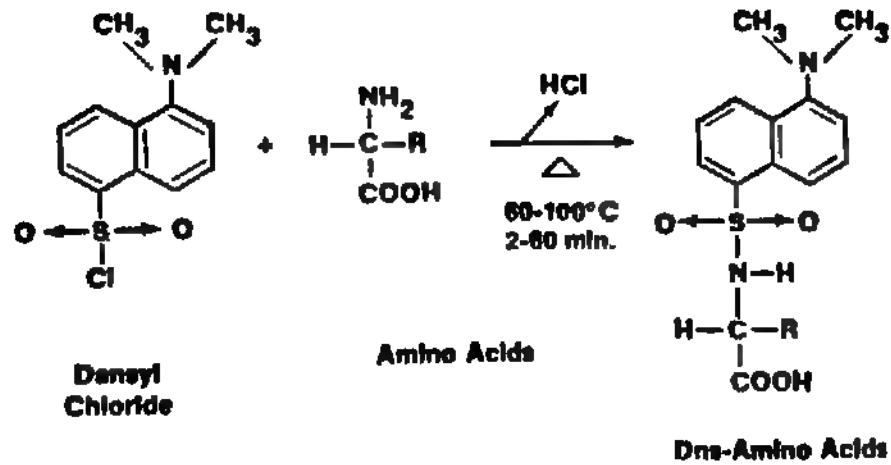
يستخدم هذا التفاعل في حماية مجاميع الأمين عند تخليق الببتيدات. ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو عدم دقة تقدير الهستدين نظراً لعدم ثبات مشتق FMCC-His وتكوين مشتقات مختلفة، كما يحتاج الأمر إلى خطوة استخلاص للتخلص من كمية الجوهر الكشاف الزائدة غير الداخلة في التفاعل. ويتم الكشف بواسطة الفلورة (تهيج عند طول موجي ٢٦٠ نانوميتر وانبعاث عند ٣٠٥ نانوميتر) وتصل الحساسية إلى ٢٠ فيكومول 20 fmol.

٨-٣-٥- دانسيل كلوريد (DANS-Cl) Dansyl chloride

Dimethylaminonaphthalene 5-sulfonyl chloride يتفاعل كلوريد الدانسيل مع مجاميع الأمين الحرة في وسط قلوي (pH ٩,٥ - ١٠,٥) لتكوين مشتقات لها خواص فلورة قوية (انظر المعادلات). تكشف هذه الطريقة عن كميات قليلة جداً من الأحماض الأمينية تصل إلى أقل من واحد نانومول من الحمض الأميني. ويلاحظ أن مشتقات الدانسيل للأحماض الأمينية تقاوم بدرجة كبيرة جدا التحليل المائي، لذلك تستخدم في تحديد أماكن الأحماض الأمينية بعد فصلها بالطرق الكروماتوجرافية باستخدام لمبة الأشعة فوق البنفسجية.

وفيما يلي خطوات تفاعل كلوريد الدانسيل:

- ١- يخلط في أنابيب صغيرة ما يلي: ١٠ ميكرو لتر حمض أميني (واحد ملليمول/ لتر)، ١٠ ميكرو لتر محلول كربونات صوديوم (٠,٤ مول/ لتر)، ٢٠ ميكرو لتر محلول كلوريد الدانسيل (٢٥ مجم/ لتر أسيتون).
- ٢- تغطي الأنابيب وتحضن على درجة ٣٧° م لمدة ساعة.



تفاعل كلوريد الدانسيل مع المركبات المحتوية على مجموعة أمين حرة يعطى هذا التفاعل مشتقات مفلورة مع الأحماض الامينية وكذلك مع مجموعة الأمين الطرفية للبتيدات في الوسط القلوي.

٣- تؤخذ كمية من مخلوط لتفاعل (٥ ميكرو لتر) وتفصل بواسطة التحليل الكروماتوجرافي ذو الطبقة الرقيقة TLC باستخدام طور متحرك: كلوروفورم- كحول أمايل رباعي- حمض خليك ثلجي (٣٠:٣٠:٧٠).

٤- يكشف عن أماكن الأحماض الأمينية المفصولة باستخدام لمبة الأشعة فوق البنفسجية.

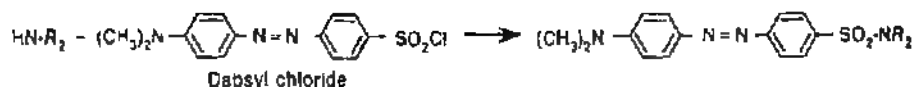
ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو بطء لتفاعل بين الجوهر الكشف والحمض الأميني.

٥-٣-٩ كلوريد الدابسيل Dabsyl chloride (DABS-Cl)

Dimethylaminoazobenzenesulfonyl chloride

هذه الطريقة لها نفس العيوب السابق ذكرها وهي غير شائعة الاستخدام.

يكشف عن مشتقات الدابسيل في المنطقة المرئية من الضوء وحساسيتها حوالى ١ بيكومول 1 p mol.



توجد طريقتان أساسيتان نعتمدان على مكان تكوين المشتقات، أى تكوين المشتقات قبل فصل الأحماض الأمينية عن بعضها البعض باستخدام العمود أو تكوين المشتقات للكشف عن الأحماض الأمينية بعد فصلها بواسطة العمود (انظر صفحة ٦٦) لذلك:

تسمى الطرق التى تعتمد على تكوين المشتقات قبل استخدام العمود باسم Pre-column

والمشتقات الشائعة هي OPA, FMOC, PITC

وتسمى الطرق التي تعتمد على تكوين المشتقات بعد استخدام العمود باسم
Post column

والمشتقات الشائعة هي الننهيدرين و OPA وفلورسكامين.

يمتاز الفصل باستخدام طريقة Pre-column مقارنة بطريقة Post-column
بالحساسية العالية، وقت التحليل قصير، ولا توجد أى صعوبات بالنسبة لكمية
العينة المراد تحليلها (الطعام أو مواد العلف).

وأهم عيوبها هي:-

١ - تكشف فقط عن الأحماض الأمينية الأولى Primary.

٢ - صعوبة تكوين المشتقات.

٣ - تداخل الكشاف أو النواتج الثانوية مع التقدير الكمي.

٤ - عدم ثبات المشتقات المزدوجة Double derivatives.

٥ - تحضير المشتق لا يكون كمياً دائماً.

ومن جهة أخرى فإن تقدير الأحماض الأمينية بطريقة Post لها عيوب

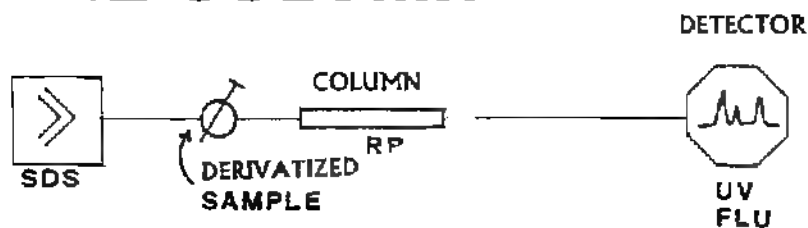
وهي:-

١ - وقت التحليل طويل.

٢ - حساسيتها أقل.

طرق إجراء المشتقات: DERIVATIZATION PROCEDURES:

PRE - COLUMN

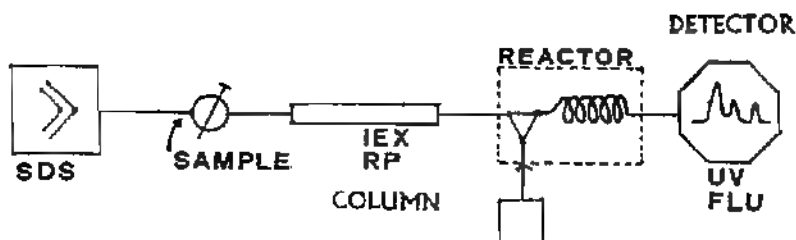


REVERSED PHASE - RP DANSYL

- RP OPA

- RP PTH

POST - COLUMN



ION-EXCHANGE - IEX NINHYDRIN

ION-EXCHANGE - IEX OPA

REVERSED PHASE RP OPA

مقارنة بين الطرق الشائعة لتقدير الأحماض الأمينية بواسطة HPLC

Post-Column		Pre-Column		وجه المقارنة
Ninhydrin	OPA/NaOCL	Dansyl	OPA	
٨٠-٣٠	٨٠-٣٠	*	*	الدقة
١٠٠	٥٠	٦٠-٢٠	٦٠-٥	وقت التحليل (دقيقة)
١٠٠	٥٠	١٠-١	١٠-١	الحساسية (p-mol)
١٠٠	٥٠	**	**	كفاءة الفصل
نعم	نعم	نعم	لا	تقدير الأحماض الأمينية الثانية
—	—	تكون مشتقات عديدة للحمض الأميني	تكون مشتقات غير ثابتة	صعوبات أخرى

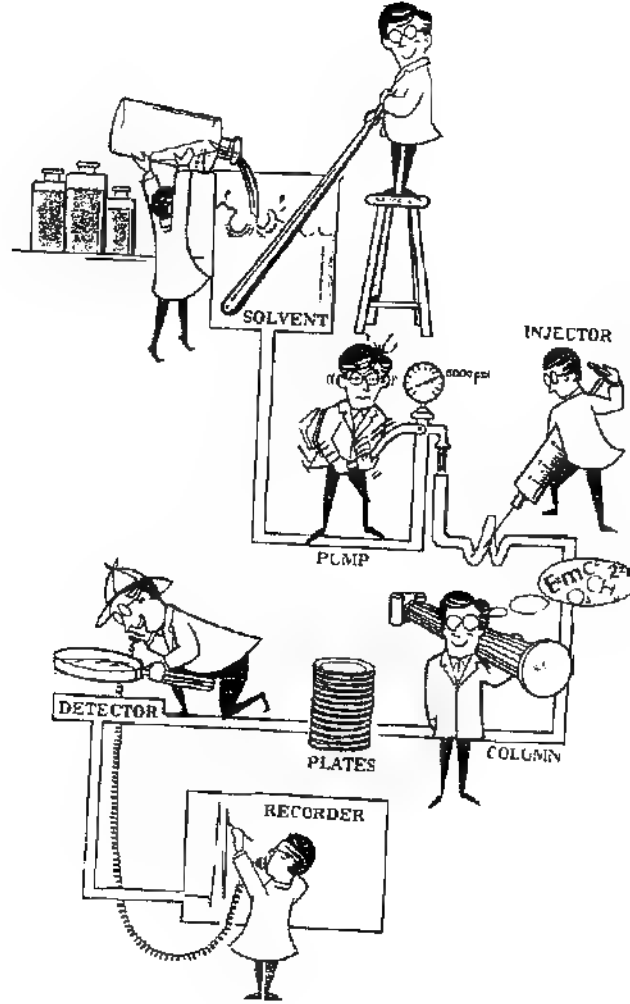
سادساً: التحليل الكروماتوجرافي السائل Liquid Chromatography

يرجع تاريخ الكروماتوجرافى الى عام ١٩٠٣ حين أجرى العالم الروسى M.Tswell تجاربه على فصل صبغات الكلوروفيل باستخدام عمود يحتوى على مسحوق الطباشير. ومضت حقبة من الزمن تم خلالها التغلب على مشكلتى: السرعة وكفاءة الفصل حيث تمكن العالمان Martin & Synge الحاصلان على جائزة نوبل عام ١٩٤٠ من وضع الأساس النظرى لميكانيكية الفصل الكروماتوجرافى الغازى وبذلك مهدا الطريق الى حدوث تطورات كبيرة من جهة الأجهزة والنظريات الخاصة بالتحليل الكروماتوجرافى الغازى ونتيجة لذلك ظهرت أجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائل والتي تعتمد على استخدام طور متحرك سائل بدلا من الغاز- وفى البداية كانت أجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائل غير دقيقة ثم تبع ذلك تحسينات تكنولوجية سواء فى المضخات ذات الضغط العالى -المواد المعبأة- الكشف عن مكونات العينة.

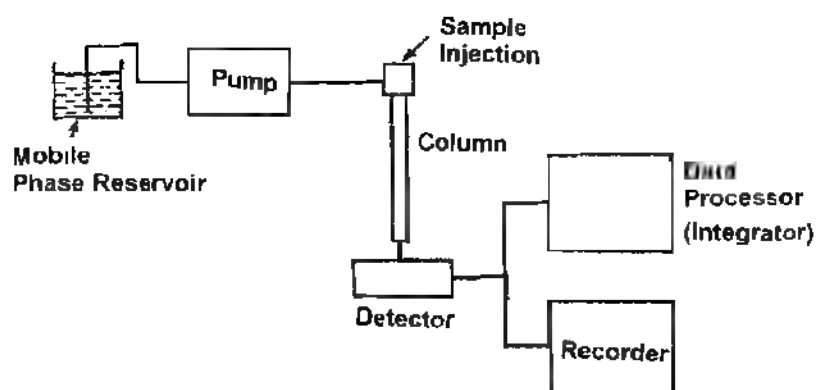
يعتبر HPLC أحد الطرق الأساسية لتحليل العديد من المواد العضوية. وهو يمتاز مثل طرق التحليل الكروماتوجرافى الأخرى بالدقة والحساسية العالية كما أن مدى استخداماته لا تعتمد على تطاير العينة أو تأثيرها بدرجة الحرارة كما هو الحال فى GLC ويمتاز جهاز HPLC بكفاءته العالية جدا بالإضافة إلى استخدامه فى فصل العديد من المركبات المختلفة.

٦-١- أساسيات: Principles of HPLC

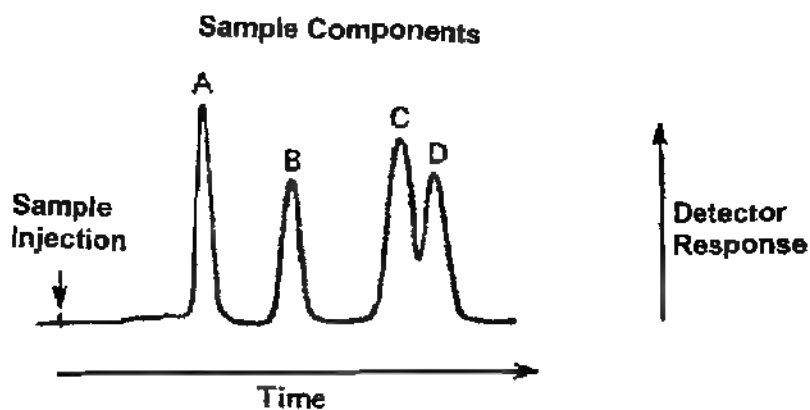
يتكون جهاز الكروماتوجرافى السائل من: مضخة- الحقن- العمود- الكاشف- المسجل. ويعتبر العمود هو قلب النظام. ويتكون الطور الثابت من جزيئات ذات حجم ميكرونى (10^{-6} M micron size) لذلك يحتاج الفصل الى مضخة ذات ضغط عال لدفع الطور المتحرك داخل العمود.



التحليل الكروماتوجرافي السائل
Liquid Chromatography



الأجزاء الرئيسية لجهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل



كروماتوجرام يبين فصل مكونات العينة

يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها وتقديرها كميًا. ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة ما بين طورين أحدهما طور متحرك والآخر طور ثابت سائل أو صلب. وعادة يكون الطور الثابت في عمود طوله حوالي ٢٥ سم وقطره الداخلي ٤ مم وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وبصفة خاصة على قطر جزيئات المادة المعبأة ويلاحظ أن خفض قطر الجزيئات يؤدي إلى تحسين أداء العمود ومن ناحية أخرى يرفع الضغط للحصول على معدل سريان مناسب للطور المتحرك خلال العمود ولهذا السبب فإن أجهزة HPLC الحديثة يعبر عنها بالضغط العالي للكروماتوجرافى السائل.

ويغض النظر إذا كانت المادة المعبأة ذات حجوم واحدة Uniform فإنه يتطلب ضغط عالي نسبيا لتعطي معدل السريان المطلوب وهو ٣ مل / دقيقة فإذا كان العمود أبعاده ٢٥ × ٤ مم ومعبأة بجزيئات قطرها ١٥ ميكرومتر فإنه يتطلب حوالي ٣٠ ضغط جوى للحصول على معدل سريان ١ مل / دقيقة من الهكسان وإلى ضغط جوى مقداره ٥٠ للحصول على معدل سريان مشابه للمذيبات الأكثر لزوجة مثل الماء والشكل في صفحة (٧٠) يبين الأجزاء الرئيسية لجهاز HPLC. تدفع المضخة الطور المتحرك داخل عمود الفصل ثم يمر خلال الـ Detector فإنه يحدث تغير في الإشارات الكهربائية حيث تسجل على خريطة متحركة لتعطي كروماتوجرام (صفحة ٧٠).

وبصفة عامة تبدأ العملية الكروماتوجرافية بحقن مكونات المخلوط Solutes في قمة العمود- يحدث الفصل بعد دفع المخلوط والطور المتحرك داخل العمود وأخيرا يفصل كل مكون من مكونات المخلوط على حدة من العمود- يكشف عن المركبات المفصولة سواء بكاشف عام universal أو خاص specific معتمدا على خواص مكونات العينة التي يجرى تقديرها. تظهر إستجابة الكاشف -Detector response نتيجة لوجود أى مكون على ورقة المسجل Chart recorder

والذى يسمى بالكروماتوجرام. ولجمع وتخزين وتحليل النتائج الكروماتوجرافية فإنه يلزم وجود حاسب آلى Computer مرتبطا مع المسجل. والجدير بالذكر أن كاشف الكروماتوجراف يعطى إشارات Signals تظهر على شكل Peaks ذو شكل ناقوسى Bell shaped والذى يمثل تركيز المكون المفصول.

يمتاز الكروماتوجرام بالآتى :-

١- الوقت الذى يأخذه أى مركب يمر خلال العمود تحت ظروف موحدة يكون ثابتا ويسمى Retention time ومقارنة أرقام الـ Retention times مع المواد القياسية يعطى وسيلة للتحليل الوصفى.

٢- تتناسب المساحة تحت كل Peak فى الكروماتوجرام تناسباً طردياً مع تركيز المكون فى العينة وبالتالي فإن التحليل الكروماتوجرافى السائل يمكن استخدامه فى التقدير الكمي.

٦-٢ تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل:-

(١) المضخة Pump

الشروط الواجب توافرها فى جهاز ضخ المذيبات كما يلى :-

أ - تعطى مقدرة على ضخ المذيب بمعدل صفر- ١٠ مل/ دقيقة.

ب - الحجم الداخلى أقل ما يمكن بحيث يعطى معدل سريان للطور السائل ثابتاً سواء عند مقدمة المضخة أو عند بداية العمود.

ج - يجب أن تكون النبضات (معدل السريان/ الضغط) أقل ما يمكن حيث أن ثبات معظم أنواع الـ Detectors يتناسب عكسياً مع النبضات -Pulsation.

د- ذات قوة ضغط عالية تعطى سريان عالي للطور المتحرك خلال الأعمدة والضغط المطلوب يعتمد على لزوجة المذيب وحجم جزيئات المادة المعبأة بالإضافة إلى أبعاد العمود.

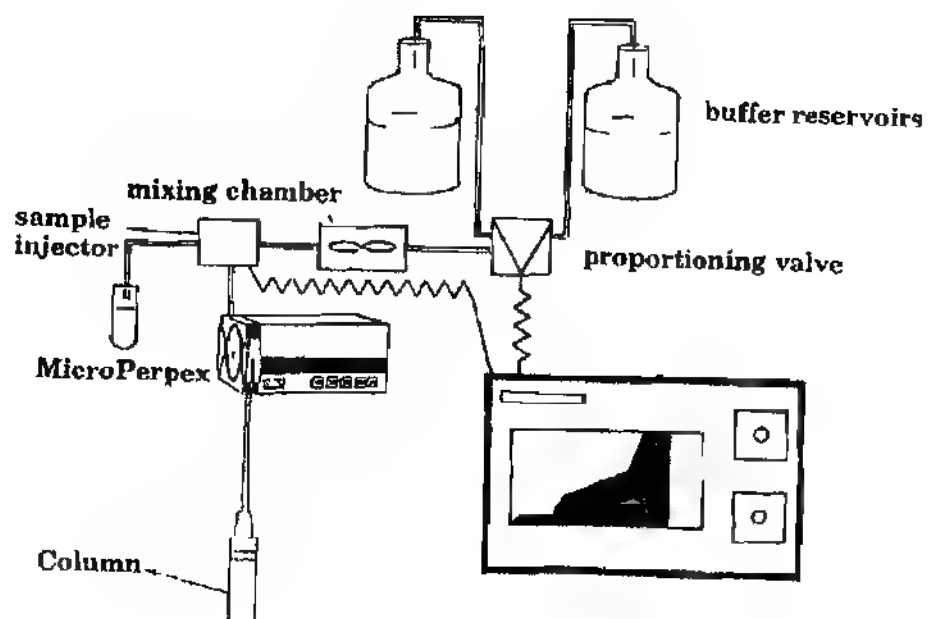
ولمنع نبضات الضغط فإنه يستعمل مضخة ذات مكبسين Dual Pistons بحيث يكون أحدهم دائما في مرحلة الضغط والآخر في مرحلة الملأ Refill.

الإستخلاص التدريجي: Gradient Elution

في بعض تطبيقات التحليل الكروماتوجرافي السائل HPLC يجب تغيير تركيب الطور المتحرك بطريقة محكمة ويسمى هذا التكنيك بالإستخلاص التدريجي ويبدأ الإستخلاص التدريجي بإستعمال طور متحرك معين واحد ثم يضاف إليه تدريجيا كميات متزايدة من المذيب الثاني خلال التحليل والتغيير المطلوب في التركيب إما أن يكون زيادة خطية في تركيز المذيب الثاني مع الوقت أو تركيب معقد (انظر صفحة ٧٤) توجد طرق متعددة لتغيير تركيب المذيب خلال عملية الاستخلاص التدريجي فباستخدام مضخة لها مكبس ذو حركة ترددية Reciprocating Piston Pump تخلط المذيبات بعد خروجها من المضخة Down Stream بواسطة صمام توزيع Proportioning Valve ويوجد صمام تحكم Controller يعطى البروجرام المطلوب في تغيير المذيب أثناء الفصل (انظر صفحة ٧٤).

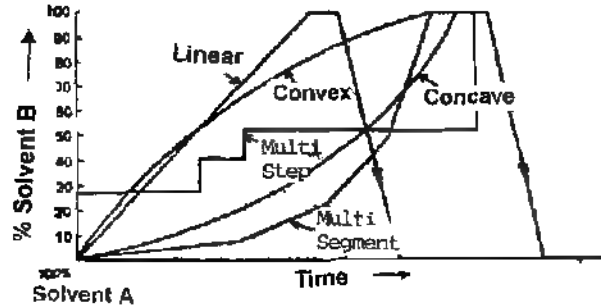
حقن العينات: Sampling

توضع العينة داخل العمود إما بواسطة محقن Syringe أو بواسطة صمام حقن والمحاقن المستخدمة عادة في GLC لا تصلح في حالة الضغط العالي للتحليل الكروماتوجرافي السائل وتوجد محاقن خاصة للـ HPLC وصمامات



جهاز يبين الاستخلاص التدريجي

الحقن لها القدرة على الحقن عند الضغط العالي وهي أيضا تحقق حجوم مضبوطة . Reproducible



برامج الاستخلاص التدريجي

الأعمدة: Columns

إن أبعاد العمود في جهاز HPLC هي ٢٥ x ٤ مم وتصنع الأعمدة أحيانا من الزجاج وعادة تستعمل أعمدة مصنوعة من الصلب Steel نظرا لضغط الطور المتحرك العالي ويجب أن يكون الجدار الداخلي للأنبوبة المكونة للعمود ناعمة Smooth ويجب أن تكون المسافة ما بين العمود والـ Detector أقل ما يمكن لمنع استعراض الـ Peak ويتم التحليل بواسطة HPLC في درجة حرارة الغرفة ولكن في بعض الحالات فإنه من المرغوب أن تكون حرارة العمود مرتفعة ولذلك تستخدم أعمدة ساخنة حيث يجرى الفصل عند درجة حرارة تقع ما بين ٦٠- ٨٠°م وأعمدة الـ HPLC غالية الثمن ولذلك يجب العناية بها لمنع تلف أدائها.

يوضع قرص Disc مسامي عند بداية العمود لمنع مرور أى مادة صلبة داخل العمود. ويلاحظ أن عدد n لهذه الأعمدة يتراوح بين ٥٠٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠٠.

الكواشف Detectors

بعد مرور الطور السائل داخل العمود يمر خلال الكاشف حيث يعطى خط Base Line ثابت ويجب أن يستجيب لمكونات العينة حيث يعطى إشارات كهربائية تظهر على هيئة كروماتوجرام ويجب أن تكون الإستجابة الكهربائية للكاشف تتناسب خطيا مع تركيز كل مكون في العينة المراد تحليلها وهذا يؤدي الى تقدير مكونات العينة كميا. (انظر صفحة ٧٧).

وعادة تكون إستجابة معظم الكواشف خطية حتى حد معين وعلى ذلك يجب التأكد من أن الكاشف يعمل حتى مدى التركيز الخطي.

والكواشف المستخدمة في حالة HPLC تقع تحت قسمين رئيسين:

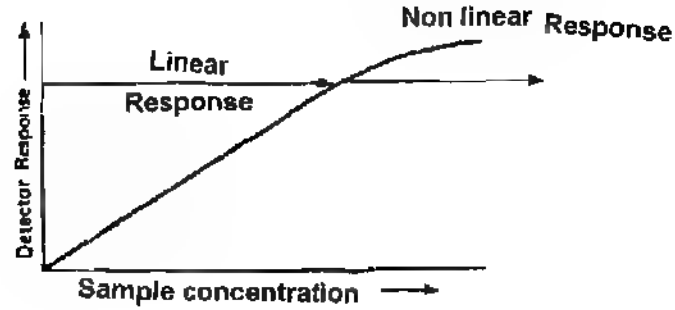
١ - كواشف تقدر بعض خصائص الطور المتحرك مثل التوصيل أو معامل الإنكسار والكواشف من هذا النوع ذات حساسية منخفضة ولكنها تكشف عن أغلب إن لم يكن كل مكونات العينة.

٢ - كواشف تقدر بعض خصائص معينة لمكونات العينة مثل الإمتصاص عند أطوال موجية معينة والكواشف من هذا النوع لها حساسية عالية وليس من الضروري أن تستجيب لكل مكونات العينة.

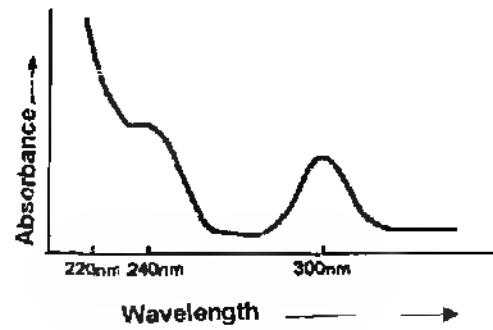
أولا: كاشف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية:

Ultraviolet absorbance detector.

يعتبر هذا الكاشف أكثر أنواع الكواشف انتشارا في التحليل الكروماتوجرافي السائل ولا تحدث تكسير لمكونات العينة ويكشف عن تركيزات قليلة جدا تصل الى ١٠^{-٩} جم من العينة (نانوجرام) وطريقة عمله تعتمد على أساس أن العديد من المركبات العضوية تمتص إشعاعات في منطقة UV والشكل في صفحة (٧٧)



العلاقة بين استجابة الكاشف وتركيز العينة



العلاقة بين الإمتصاص عند أطوال موجية مختلفة وتركيز مكون العينة

يبين منحنى الإمتصاص الطيفي ويلاحظ أن أقصى إمتصاص يحدث عند طول موجة واحدة.

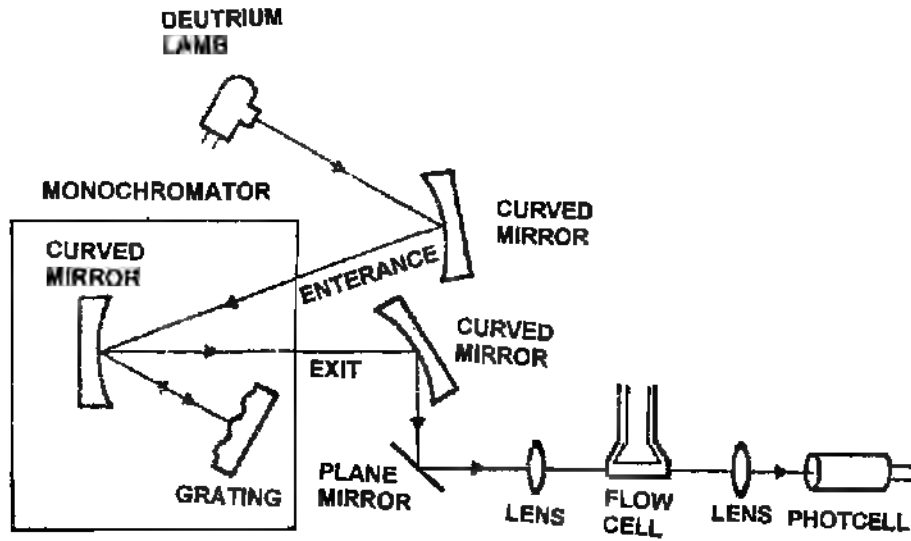
ويحدث نتيجة لإمتصاص أشعة UV تغير في الطاقة الداخلية للجزء وبالتالي تغير في تركيبة الإلكترونات فالمركبات التي تحتوى على روابط مشبعة تمتص كمية قليلة من شعة UV بالمقارنة بالمركبات غير المشبعة.

وفي الحقيقة أن الإمتصاص لوجود رابطة زوجية واحدة يكون نسبيا ضعيفا وتظهر أقصى إمتصاص عند طول موجة من ١٩٠ - ٢٠٠ وفي حالة الروابط غير المشبعة المتبادلة Conjugated لمركب فإنه يمتص مقدار كبير وأن أقصى إمتصاص يتحرك نحو طول الموجة الأطول.

تسمى المجموعة الفعالة في الجزء والتي تسبب امتصاص في UV مجموعة كروموفورية وتوجد مجاميع لا تمتص في منطقة UV في الجزء ولكن تؤثر في ال Spectrum عن طريق انتقال أقصى امتصاص أو زيادة أو خفض قيمة الإمتصاص وبصفة عامة فإن المجاميع غير القطبية مثل الميثايل لها تأثير قليل في حين أن المجاميع القطبية مثل الأمين أو لنيترو تستطيع أن تغير جوهريا في Spectrum الخاص بالمركب. والامتصاص في منطقة ال UV يحكمه قانون Beer- Lambert، الذي يربط ما بين نسبة الضوء الساقط الى الضوء الناقد مع تركيز المركبات في محلول العينة وطول الخلية التي بها العينة وعند أى طول موجى فإن:

$$\text{Log } I_0 / I = KCL \dots \dots \dots (1)$$

ويعرف الإصطلاح $\text{Log } I_0 / I$ باسم Absorbance والثابت K يسمى معامل الإمتصاص Extension Coefficient، ومن المعادلة (١) يتضح أنه



رسم تخطيطي يبين مكونات كاشف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية

عندما يمر شعاع في منطقة ال UV خلال محلول العينة في خلية ذات أبعاد ثابتة فإن الإمتصاص يتناسب خطياً مع تركيز العينة.

ومصدر إشعاعات UV في حلة الكاشف UV لجهاز HPLC هو لمبة زئبق أو لمبة الديتريم ولمبة الزئبق تبعث دائماً إشعاع ذو طول موجي واحد وهو ٢٥٤ نانومتر والكواشف التي تعمل بمصدر الإشعاع هذا تعمل فقط عند هذا الطول الموجي وللقياس عند أطوال موجية أخرى فإنه لابد من تغيير الللمبة ثم يخرج إشعاعات ذات أطوال موجية في المدى من ١٩٠ - ٣٨٠ وباستخدامها مع موحد الموجات Monochromator فإنه يمكن إجراء التقدير الكمي على المدى ١٩٠ - ٣٨٠.

والكواشف التي تعمل على أطوال موجية مختلفة تتميز عن الكواشف التي تعمل عند طول موجة واحدة بالآتي:-

١- يمكن ضبط طول الموجة التي تحدث عندها أقصى امتصاص للمادة المراد تقديرها للوصول الى أقصى حساسية.

٢- في بعض التحليلات يكون لها النصفة الإختيارية Sensitivity فمثلاً في حالة التحليلات الدقيقة جدا Trace analysis فإنه يمكن التحكم في اختيار طول الموجة التي عندها فقط تمنص المركبات الموجودة على هيئة آثار وبالتالي تمنع مشاكل التداخل من وجود مكونات ذات تركيز عالي بالعينة.

ثانياً: كاشف معامل الإنكسار (RI) Refractive index

يعتمد عمل هذا الكاشف على تقدير معامل الإنكسار للطور المتحرك حاملاً المركبات المفصولة. يجب أن تكون درجة حرارة خلية العينة Sample cell

وحلية البلاك Blank Cell ثابتة وإن الاختلاف في درجة الحرارة يكون في حدود ٠,٠٠١ م. وحساسية هذه الكواشف أقل من حساسية كواشف UV فهي تكشف في حدود ١٠^{-٦} جم من العينة (ميكروجرام). تستخدم هذه الكواشف في حالة المركبات التي ليس لها خواص الإمتصاص.

ثالثاً: الكواشف الفلورية: Fluorimetric

يعرض محلول المركبات المفصولة من العمود إلى أشعة فوق البنفسجية من هذه الكواشف عند طول موجة معينة Excitation wavelength (أشعة تؤدي الى تهيج مكونات العينة) وتخرج الطاقة الفلورية من محلول العينة عند طول موجي أطول Emission wavelength (طاقة انبعاث) وهي التي يجري قياسها. تستخدم هذه الكواشف في تقدير المركبات التي لها خاصية الفلورة أو مع المركبات التي تتحول الى مشتقات فلورية. تمتاز هذه الكواشف بأن لها حساسية أعلى من كواشف الأشعة فوق البنفسجية ولذلك تستخدم في تقدير المركبات التي توجد على هيئة آثار.

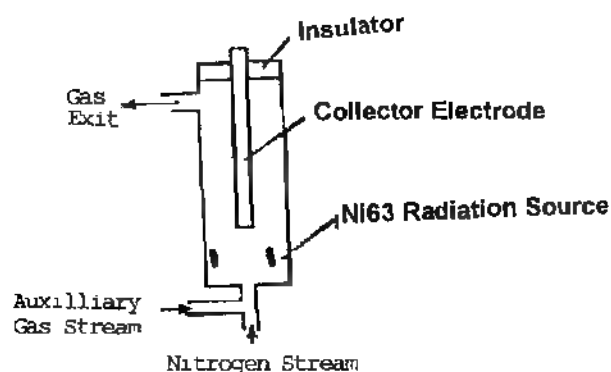
رابعاً: Electron Capture detector (ECD)

يمتاز هذا الكاشف بحساسية عالية وله الصفة الاختيارية ويتكون من مصدر إشعاع Ni^{63} وزوج من الإلكترونات يمر خلالهما فولت قطبي Polarizing Voltage. يمر غاز خامل مثل النيتروجين خلال الكاشف الذي يحدث له تأين بواسطة الإشعاع Radiation. ونتيجة لهذا التأين يمر تيار ما بين الإلكترونين الذي يكبر ويسجل. والشكل في صفحة (٨٢) يبين تركيب الكاشف ECD.

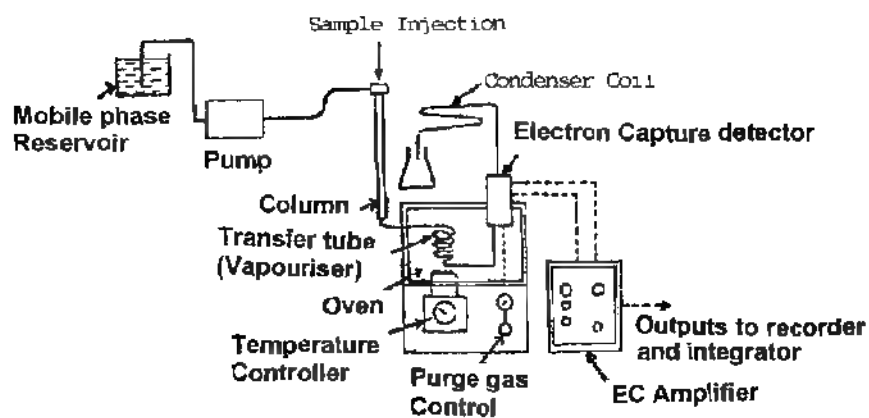
تظهر بعض المركبات تألف للإلكترونات فإذا دخلت مادة من هذا النوع خلال ECD فتكون النتيجة هي خفض عدد الإلكترونات في الحجرة وبالتالي يقل



تأين غاز النيتروجين بأشعة بيتا



أجزاء كاشف ECD



رسم تخطيطي يبين مكونات جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل مزود بكاشف ECD

التيار المار ما بين الإلكترودين ومن ناحية أخرى نجد أن المركبات التي ليس لها تآلف للإلكترونات عند مرورها خلال الكاشف تحدث تأثير قليل أو ليس لها تأثير على Standing current وعلى ذلك فإن ECD له الصفة الاختيارية ويستجيب فقط للمركبات التي ترتبط بالإلكترونات مثل الهالوجينات ومركبات نيترو وبعض المواد الأخرى ذات الأنوية العطرية المتعددة.

يمر Column eluent خلال أنبوبة من الحديد الغير القابل للصدأ حيث يسخن الى درجة حرارة كافية لتطير المذيب ومكونات العينة. ثم تمرر الأبخرة الى ECD عن طريق تيار من النيتروجين. وهناك أنبوبة متصلة بالـ ECD من الحديد الغير قابل للصدأ تعمل كمكثف حيث يجمع الطور المتحرك السائل.

وأن أفضل مذيب كطور متحرك في نظام EC/LC هو الذي يظهر أقل تآلف ممكن بالنسبة للإلكترونات مثل الهكسان أو الأيزوأوكتان ولكن يفضل كروماتوجرافيا استخدام طور متحرك أكثر قطبية. ويمكن استخدام طور متحرك يتكون من هكسان أو أيزوبروبانول مضافا اليه مذيبات مثل الميثانول- أيزوبروبانول- الخ.. وهذا يؤدي الى رفع قطبية الطور المتحرك وتسمى المذيبات التي ترفع من قطبية الطور المتحرك باسم Modifiers وتعتمد الكمية التي تضاف من هذه المذيبات على نوع الـ Modifier ومعدل السريان، فيما يلي أنواع الـ Modifier المعتاد إضافتها لرفع قطبية الطور المتحرك وهي: ٣٪ ميثانول- ٧.٥٪ أيزوبروبانول- ١٥٪ نتراهدروفيوران- ١٠٪ Dioxin- ١٥٪ بنزين.

ويجب عدم استخدام مذيبات تحتوي على أكسجين حيث تعمل على الارتباط مع الإلكترونات ولذلك يجب إمرار غاز النيتروجين خلال الطور المتحرك للتخلص من الأكسجين. أيضا يجب تخلص المذيبات من الشوائب التي ترتبط مع الإلكترونات.

٦-٣- الطور المتحرك: Mobile phase

يقوم الكروماتوجرافى السائل بتحليل العينات التى تختلف فى درجة ذوبانها ويتم فصل مكونات العينة نظرا لوجود تداخل Interaction ما بين مكونات العينة والمادة المعبأة والطور المتحرك- ويجب أن تذوب العينة فى الطور المتحرك كما يجب أن يلائم الطور المتحرك نظام الكشف Detection system فإذا كان الكاشف من نوع UV مثلا فإنه يجب على الطور المتحرك ألا يظهر أى امتصاص على طول الموجة التى يجرى عليها التقدير.

الققطبية: Polarity

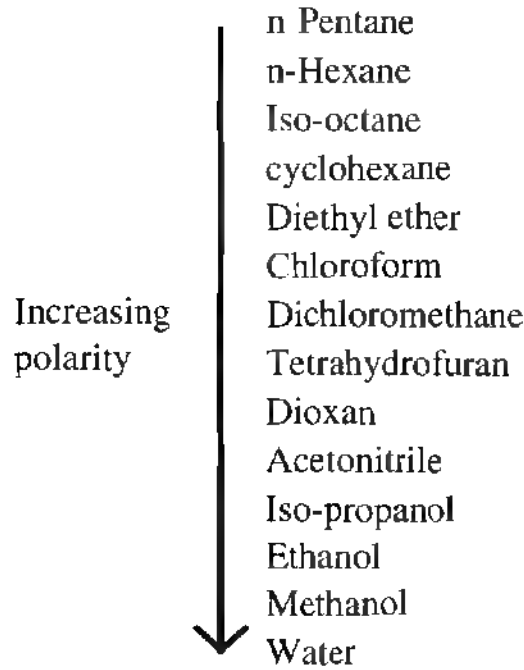
يستخدم لفظ الققطبية بكثرة فى التحليل الكروماتوجرافى لوصف خصائص المواد المعبأة داخل العمود -الأطوار المتحركة- والمواد عديمة الققطبية هى التى لا تحتوى فى تركيبها الجزئى على مجاميع فعالة تكون روابط ايدروجينية مثل الهيدروكربونات المشبعة (هكسان مثلا) والمواد الققطبية هى التى تحتوى على مجاميع فعالة مثل هيدروكسيل- أمين- كربوكسيل.... الخ.

وتقسم المذيبات المستخدمة فى جهاز HPLC كطور متحرك تبعا لققطبيتها ويختلف الى حد ما سلوك المذيب تبعا لنوع المواد المعبأة داخل العمود والشكل فى صفحة (٨٥) يبين عدة مذيبات مرتبة تبعا لققطبيتها باستخدام عمود معبأ بمادة السليكاجيل. ويمكن تحضير طور متحرك ذو ققطبية معينة عن طريق خلط مذيبين أو أكثر يختلفان فى الققطبية.

والجدير بالذكر أن انفصل لجيد فى حالة GLC يعتمد على اختيار العمود حيث توجد أعمدة معبأة بأطوار ثابتة عديدة وفى حالة HPLC فإن الفصل الجيد يعتمد على نوع وظروف الطور المتحرك وعلى ذلك:

تعتمد كفاءة الفصل على إتباع النقاط التالية:

- ١- نوع الطور المتحرك سواء كان عضوي أو مائي.
- ٢- تركيب الطور المتحرك سواء أكان مذيب واحد أو أكثر من مذيب.
- ٣- درجة حموضة pH الطور المتحرك.
- ٤ - المواد التي تضاف الى الطور المتحرك مثل الأمينات- الأحماض- محاليل منظمة- منظفات.



* المذيبات شائعة الاستخدام في جهاز لتحليل الكروماتوجرافي السائل مرتبة تبعا لقطبيتها

ويشترط في الطور المتحرك ما يلي:-

- ١- نقي
- ٢- رخيص الثمن وسهل الحصول عليه
- ٣- تذوب فيه مكونات العينة

- ٤- لا يغير في طبيعة العمود.
- ٥- يلائم الكاشف.
- ٦- له لزوجة منخفضة.
- ٧- يمكن استرجاعه من العينة بسهولة وإعادة استخدامه مرة أخرى إذا أمكن ذلك.

يجب قبل استخدام الطور المتحرك إتباع ما يلي :

- ١- يرشح قبل دخوله المضخة لمنع انسداد الصمامات Valves .
- ٢- يجرى إزالة الهواء من الطور المتحرك لأن الهواء يؤدي عند دخوله الى الكاشف الى تكوين noise بجانب الإشارات Signals .

تخلص الطور المتحرك من الهواء، Solvent degassing

يذوب الهواء في كل المذيبات المستخدمة كطور متحرك في HPLC ومع ذلك فإن درجة ذوبان الهواء تختلف اختلافا كبيرا فالمذيبات القطبية وبصفة خاصة الماء لها درجة ذوبان عالية بينما المذيبات الغير القطبية مثل الهكسان لها درجة ذوبان منخفضة. ويؤدي الهواء المذاب في المذيب الى تقليل كفاءة صمامات المضخة وأيضاً عند استخدام كاشف UV تتكون فقاعات في الخلية Flow cell مما يؤدي الى عدم ثبات Base line ولهذا يجب التخلص من الهواء في المذيب قبل استخدامه.

وهذا يتم بعدة طرق منها :-

- ١- غليان المذيب تحت مكثف عاكس يتبعه التبريد قبل الإستعمال .
- ٢- استخدام تفريغ .

٣- امرار غاز الهيليوم خلال المذيب حيث يحل الهيليوم محل الهواء الذي له درجة ذوبان منخفضة جدا.

٤- استخدام جهاز Ultrasonic لطرد الهواء.

توجد ثلاث طرق لإمرار الطور المتحرك خلال الطور الثابت وهي:

١- استخلاص متدرج Gradient elution.

٢- تدرج حرارى Temperature programming.

٣- تدرج فى معدل السريان Flow programming.

والتكنيك الأول هو الأكثر كفاءة حيث يعطى فصل واضح بالمقارنة بالطريقتين الأخيرتين.

يختلف الإستخلاص المتدرج عن الاستخلاص الثابت Isocratic elution

(استخلاص بطور متحرك ذو تركيب ثابت) فى أنه:

١- يقلل من حدوث Tailing لل Peak.

٢- يقلل من مقدار عرض قاعدة ال Peaks أى تزيد من حساسية وكفاءة الفصل.

التوزيع Distribution

عند إضافة مادة ما الى نظام مكون من سائلين لا يمتزجان فإنه تختلف قابلية هذه المادة للذوبان فى كلا السائلين وأن تركيز المادة فى الطورين تكون ثابتة عند درجة حرارة معينة وتعرف نسبة التوزيع بمعامل التوزيع Partition coefficient وفى حالة التوزيع الكروماتوجرافى يتم فصل مكونات العينة عن طريق استخدام التوزيع المنافس للعينة ما بين الطورين السائلين إحداهما الطور

الثابت داخل العمود والآخر الطور المتحرك. ويعتمد هذا التوزيع على الذوبان النسبي Relative solubility للمكونات في كل الطورين. ونظرا لإختلاف الذوبان النسبي لمكونات المخلوط فإنها تمنى Spent أوقات مختلفة في الطور الثابت وفي النهاية يخرج من العمود كل مكون على حده وعلى مدى التداخلات مع الطور الثابت فإنها تتحكم في درجات الارتباط (المركبات ذات الارتباط المنخفض تخرج Elute من العمود قبل المكونات الأكثر ارتباطا). وتبعاً لطبيعة حاصية التوزيع فإنه يوجد نوعان وهما الفصل العادي Normal phase والفصل المعاكس Reverse phase وفي حالة الفصل العادي يستخدم طور ثابت قطبي لفصل مكونات العينة القطبية وطور متحرك غير قطبي أما طريقة الفصل المعاكس فإنه يستخدم طور ثابت غير قطبي وطور متحرك قطبي لفصل المركبات غير القطبية.

Normal phase chromatogram	Reverse phase chromatogram
طور ثابت: قطبي	طور ثابت: غير قطبي
طور متحرك: غير قطبي	طور متحرك: قطبي
قطبية المخلوط: قطبي	قطبية المخلوط: غير قطبي

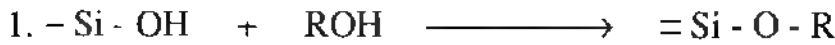
٦-٤- الأطوار الثابتة المرتبطة كيمياويا

Chemical bounded stationary phases

يلاحظ في الأعمدة المستخدمة في أجهزة HPLC أن الطور الثابت يغطي مادة دعامية مثل السليكا ويرتبط فقط بقوى طبيعية Physical forces ويجب أن يظل تركيز الطور الثابت داخل العمود ثابتاً ولهذا فإنه من الضروري استخدام طور متحرك لا يذيب الطور الثابت وأنه من الصعوبة عمليا وجود نظام يشتمل على طور ثابت/ طور متحرك لا يفقد من العمود باستمرار كميات من الطور الثابت نظرا لذوبانه في الطور المتحرك وللتغلب على هذه المشكلة فإنه من

الممكن تشبييع الطور المتحرك بواسطة الطور الثابت قبل مروره داخل العمود وحيث أن الذوبان يعتمد على درجة الحرارة فإنه يجب أن يظل المتشبع Satura-tor والعمود عند نفس درجة الحرارة.

وهناك حل أفضل لهذه المشكلة وهو أن يرتبط الطور الثابت كيمائياً على سطح المادة الدعامية وهذا يجعله غير ذائب في الطور المتحرك وهناك العديد من التفاعلات المختلفة التي تستخدم لربط الجزيء العضوي الى سطح السيليكا كما في المعادلات التالية (انظر صفحة ٨٩). الرابطة Si-O-R يمكن تحليلها مائياً وعلى ذلك يمكن استخدام مذيبات مائية كطور متحرك في هذا النوع من الأعمدة والرابطة Si-R & Si-O-Si-R₃ شديدة الثبات ويمكن إستخدام هذه الأطوار الثابتة مع جميع المذيبات الشائعة في أجهزة HPLC ونتيجة إختلاف التركيب الكيماوي للأكليل (R) فإنه يمكن الحصول على أطوار ثابتة مرتبطة كيمائياً ذات مدى واسع من القطبية. والجدول في صفحة (٩٠) يبين الرموز الكيميائية لأهم الأطوار الثابتة المرتبطة كيمائياً على سطح مادة السيليكاجيل.



Silica surface



3. (a)



4. (b)



تكوين الأطوار الثابتة المرتبطة كيمائياً على مادة السيليكا

المواد المعبأة شائعة الاستخدام المحتوية على روابط كيميائية

stationary phase	Type	PELLICULAR	MICROPOROUS
octadecyl (C ₁₈)	non polar (aliphatic)	CO:PELL ODS PERMAPHASE ODS BONDAPAK C ₈ CORASIL PERISORB RP BONDAPAK PHENYL/CORASIL CO:PELLPAC	PATISIL 10 ODS
phenyl	non polar (aromatic)		ODS-HYPERSIL LICHROSORB C ₁₈
alkyl nitrate (cyano)	medium polarity		PARTISIL 10 PAC LICHROSORB-CN
ether	medium polarity		
alkyl amine (-NH ₂)	medium polarity	PERMAPHASE ETH	LICHROSORB NH ₂
diol	high polarity		μ-BONDAPAK NH ₂ LICHROSORB DIOL

يوجد نوعان من الأطوار الثابتة وهما:

النوع الأول:

يعبأ العمود بمادة ذات محيط دائري قطره حوالي ٤٠ ميكرون وسمك الطور الثابت حوالي ١-٢ ميكرومتر ويسمى Pellicular وهو سهل التعبئة وذو كفاءة فصل جيد.

النوع الثاني:

تستخدم جزيئات صغيرة جدا من مادة السيليكا مسامية (5-10 um) وهذه الجزيئات Micro particulate phase chromatography صعبة في تعبئتها بالمقارنة بالنوع الأول ولكنها تعطى فصل أفضل بكثير.

وعموما توجد ثلاثة أنواع من الأطوار الثابتة وهى:

١ - جزيئات شديدة الصلابة Solid particles

٢ - جزيئات مسامية بدرجة بسيطة Pellicular resin

٣ - جزيئات مسامية بدرجة عالية Porous resin

يتكون النوع الأول من مادة شديدة الصلابة Rigid وذات تركيب خارجي غير منفذ ونتيجة لسطحه الصلب فإنه يكتسب خاصية الفصل السريع ونظرا لصغر مساحة سطحه الخارجى فإنه تستخدم حجوم صغيرة من العينة ونقل كفاءة الفصل بزيادة حجم المخلوط المراد فصل مكوناته وعندما تكون مساحة السطح الخارجى للطور الثابت كبيرة كما فى حالة النوع الثانى فإنها تزيد من كفاءة الفصل وأيضا يزداد حجم المخلوط المحقون . وفى النوع الثالث ذو المسامية العالية فإنها تعطى فصل عالى جدا ولكن قد تزيد من وقت التحليل . ويوجد عامل آخر

هام يؤثر على الفصل وهو حجم الجزيئات. فالجزيئات ذات القطر الصغير تؤدي الى تحسين كفاءة الفصل وعلى ذلك يجب استخدام الجزيئات الصغيرة كلما أمكن ذلك. ووجد أن القطر المثالي وهو ٣ ميكرون كما أن قطر الجزيئات حتى ١٠ ميكرون تعطي فصل جيد وعند زيادة القطر عن ذلك تنخفض كفاءة الفصل- وهناك نقطة أخرى هامة وهي يجب أن تكون أقطار الجزيئات متجانسة وأن أي اختلاف في القطر يؤدي إلى سلوك مكونات المخلوط مسارات متعددة وهذا يقلل من كفاءة الفصل.

والجدول التالي (صفحة ٩٣) يبين بعض المواد المعبأة المحتوية على روابط كيميائية وشائعة الإستعمال.

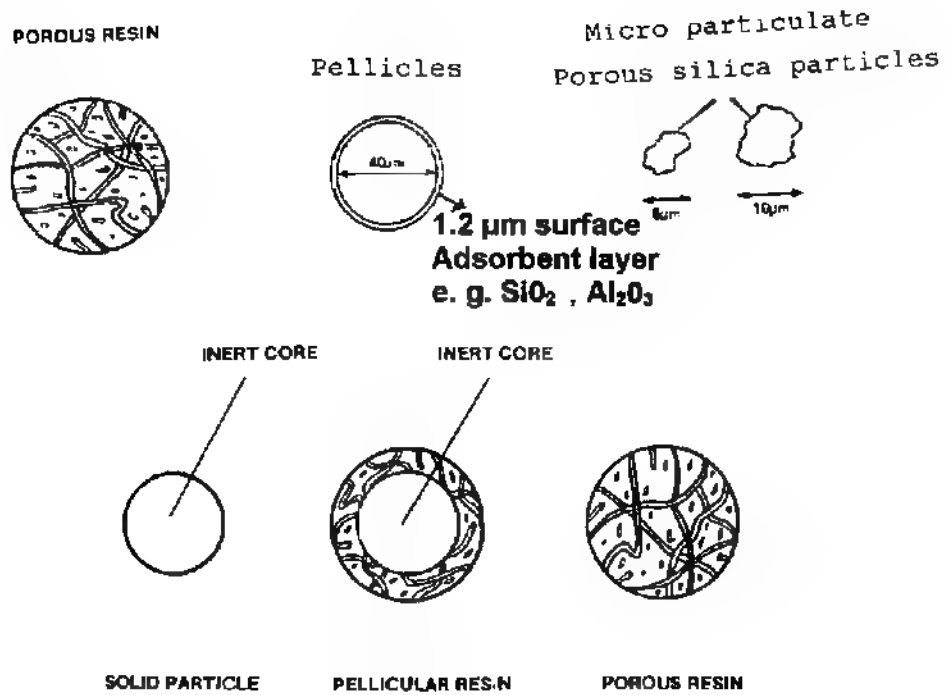
اختيار المادة المعبأة والطور المتحرك:-

عند اختيار المادة المعبأة والطور المتحرك لفصل مكونات العينة بواسطة جهاز HPLC يجب الأخذ في الاعتبار بالنقاط التالية:

- ١- التركيب الكيميائي لمكونات العينة أو بمعنى آخر نوعية المجاميع الفعالة (حامضية، قاعدية، ألدهيدية... الخ).
- ٢- ذوبان مكونات العينة هل تذوب في مذيب عضوي، تذوب في ماء، تذوب في قلوي، تذوب في حمض.
- ٣- توافق استجابة مكونات العينة مع الكاشف.

٥-٦- التقدير الكمي Quantitative analysis

تختلف إستجابة الكاشف في HPLC من مركب الى آخر فمثلا إستجابة UV تعتمد على معامل الإمتصاص لمكونات العينة وإستجابة الكاشف ECD يعتمد على نألف إلكترونات العينة وأن أفضل طريقة للتقدير الكمي هي عمل Calibra-



* الاطوار الثابتة

* التركيب الكيماوى لبعض أنواع الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا على سطح مادة السيليكا

MODE	FUNCTIONALITY	STRUCTURE OF BONDED GROUP
	AMINO	$-NH_2$
	CYANO (NITRILE)	$-CN$
NORMAL PHASE	DIOI	$ \begin{array}{c} \\ -Si-O-CH_2-CH-CH_2OH \\ \quad \quad \\ O \quad \quad OH \\ \\ -Si-O-CH_2-CH-CH_2OH \\ \quad \quad \\ O \quad \quad OH \\ \\ -Si-O-CH_2-CH-CH_2OH \\ \quad \quad \\ \quad \quad OH \end{array} $
	DIMETHYLSILYL	$ \begin{array}{c} CH_3 \\ \diagup \\ =Si \\ \diagdown \\ CH_3 \end{array} $
REVERSED OCTYLSILYL PHASE		$\equiv Si-CH_2-(CH_2)_6-CH_3$
	OCTADECYLSILYL	$\equiv Si-CH_2-(CH_2)_{16}-CH_3$
	PHENYSILYL	$\geq Si-\text{C}_6\text{H}_4-OH$

tion لإستجابة الكاشف بإستخدام مركب قياسي Reference يضاف إلى محلول العينة أى طريقة Internal standardization وهى تشمل الخطوات التالية:-

١- يجرى تحليل للعينة للحصول على كروماتوجرام لمعرفة عدد ونوع مكوناتها. تختار مادة لا توجد ضمن مكونات العينة ولها وقت ظهور يقع ما بين Two peaks للعينة على الكروماتوجرام.

٢- تقدر استجابة الكاشف لكل مكون من مكونات العينة منسوباً إلى المادة الداخلية وذلك بإجراء التحليل للعينة المحتوية على المادة القياسية ويجب معرفة تركيز كل مكون من مكونات العينة بالضبط ويلاحظ أن: مساحة الـ Peak لأى مكون تتناسب طردياً مع تركيزه فى العينة.

.. مساحة الـ Peak = $K \times$ تركيزه فى العينة

حيث أن K هو معامل إستجابة الكاشف لمركب معين

وبالنسبة إلى المكون A (انظر صفحة ٩٦) فإن:

$$\text{Peak area (A)} = K_A \times \text{Concentration (A)} \dots\dots (1)$$

وبالنسبة للمادة القياسية الداخلية (IS) فإن

$$\text{Peak area (IS)} = K_{IS} \times \text{Concentration (IS)} \dots\dots (2)$$

بقسمة المعادلة (١) على المعادلة (٢) نستنتج ما يلى:

$$\text{Peak area (A)} / \text{Peak area (IS)} = (K_A / K_{IS}) \times \text{Concentration (A)} / \text{Concentration (IS)} \quad (3)$$

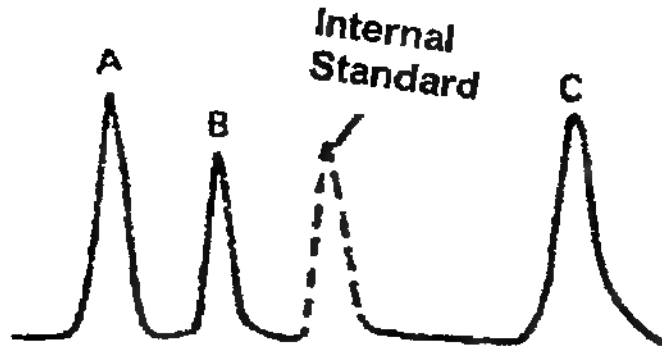
تعرف النسبة K_A / K_{IS} بمعامل استجابة الكاشف للمركب A منسوباً إلى المادة القياسية أو K_I بالنسبة للمكون الأول وتجرى نفس العملية بالنسبة لباقي مكونات العينة لإستنتاج قيم معاملات الإستجابة لها (k_2, k_3, K_4, \dots etc).

وعملها تضاف كمية معروفة بالضبط من المادة القياسية الى العينة المراد تحليلها ثم يجرى التحليل بواسطة جهاز الكروماتوجرافى ومن المعادلة (٣) نستنتج المعادلة (٤).

$$\text{Concen. (A)} = \text{Peak area (A)} / \text{Peak area (IS)} \times \text{Concen. (IS)} / K_1 \quad (٤)$$

بوضع قيم مساحات الـ Peaks من الكروماتوجرام ومعاملات الإستجابة النسبية من التحليل Calibration analysis وتركيز المادة القياسية المضاف فى المعادلة (٤) فإنه يمكن حساب تركيز كل مكونات العينة.

وحيث أن هذه الطريقة تعتمد على نسبة مساحات الـ Peaks وليس على وزنة العينة فإن دقة القياس فى هذه الطريقة لا تعتمد على الكمية المحقونة بالضبط ولكن تعتمد على دقة حساب مساحات الـ Peaks.



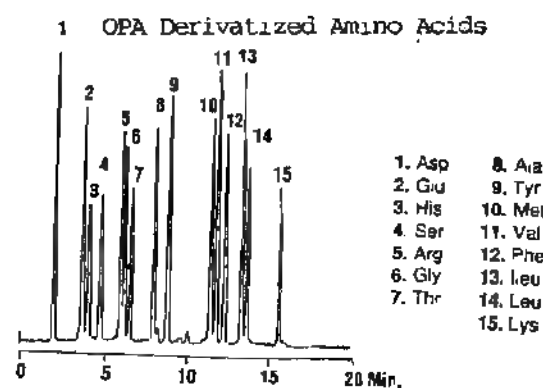
* كروماتوجرام يبين فصل مكونات عينة ما بالإضافة إلى مادة قياسية داخلية

٦-٦- ظروف الفصل المختلفة لبعض مشتقات الأحماض الأمينية:

١- مشتقات OPA للأحماض الأمينية:-

Altima C18	نوع العمود
٢٥٠ X ٤ سم	أبعاد العمود
A: 50 mM Na Ac buffer, pH 5.7, 5% THF THF = Tetra Hydro furan	تركيب الطور المتحرك
الزمن (دقيقة): صفر ١٥ ٥ ١٠ ٦٥ ١٠ : %B	برنامج الاستخلاص التدريجي
٢ مل / دقيقة	معدل سريان الطور المتحرك
Fluorescence	الكاشف

الكروماتوجرام التالي يبين تتابع ظهور مشتقات OPA للأحماض أمينية.

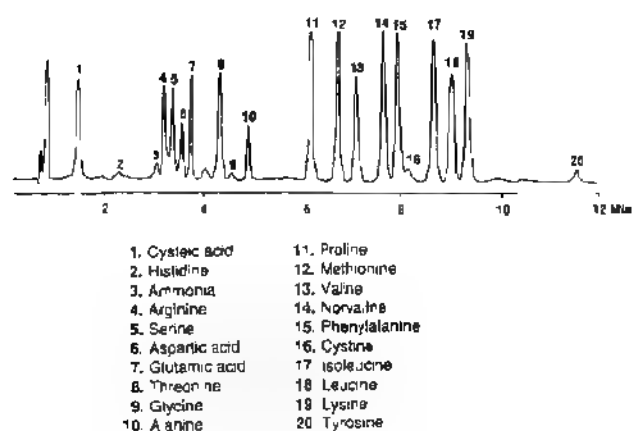


٢ - مشتقات Dansyl للأحماض الأمينية:

Aquapore RP- 300 C8	نوع العمود
٢٢٠ X ٤,٦ مم	أبعاد العمود
٥٥ م	درجة حرارة العمود
A: 0.05 M Formic acid, 0.06 M Acetic Acid, to pH 2.6 with Na OH B: A with 35% V/V isopropanol	تركيب الطور المتحرك
الزمن (دقيقة): صفر ٣٠ ٨,٥ ١,٥ ٨٥ ١٠ ٣٥ صفر B%	برنامج الاستخلاص التدريجي
٤ مل / دقيقة	معدل سريان الطور المتحرك
UV عند طول موجة ٢٥٤	الكاشف

والكروماتوجرام التالي يبين تتابع ظهور مشتقات Dansyl للأحماض الأمينية .

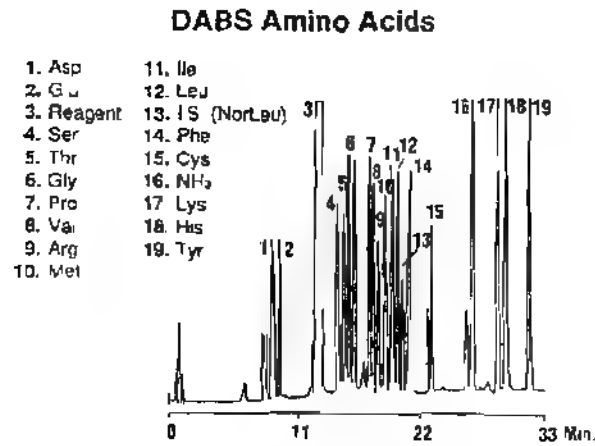
Dansylated Amino Acids



٣- مشتقات DABS للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Spheri-RP 18
أبعاد العمود	٢٢٠ x ٤,٦ مم
تركيب الطور المتحرك	A: Na O Ac with 5% DMF, pH 6.5 B: Acetonitrile DMF: Dimethyl Formamide
برنامج الاستخلاص التدريجي	الزمن (دقيقة): صفر ٣٠ ٤٢ ٤٤ ٤٦ B%: ١٠ ٣٥ ٥٥ ٥٥ ٨٥
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل / دقيقة
الكاشف	UV/VIS عند طول موجة ٤٣٦

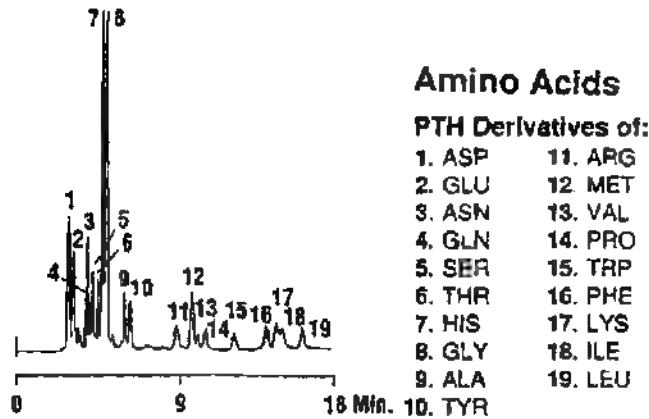
والكروماتوجرام التالي يبين تتابع ظهور مشتقات DABS للأحماض الأمينية .



٤ - مشتقات ال PTH للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Ultrasphere C18
أبعاد العمود	٢٥٠ x ٤,٦ مم
درجة حرارة العمود	٥٥ م
تركيب الطور المتحرك	A: 0.1 M Na OAc: Acetonitrile, pH4.9
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل/ دقيقة
الكاشف	UV عند طول موجة ٢٥٤

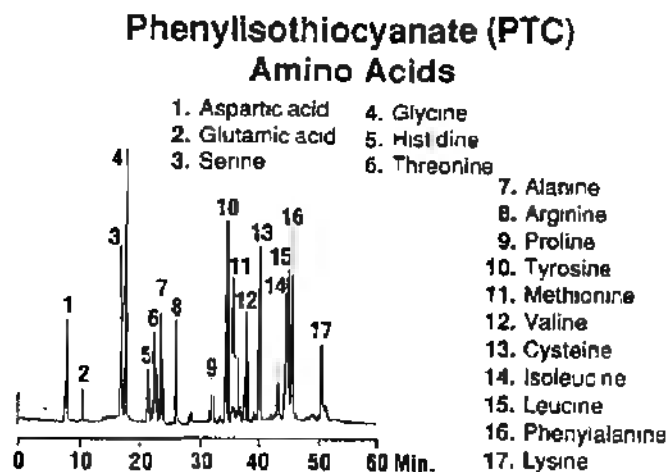
والكروماتوجرام التالي يبين تتابع ظهور مشتقات ال PTH للأحماض الأمينية.



٥- مشتقات الـ PTH للأحماض الأمينية:-

Econosphere- C8	نوع العمود
٢٥٠ × ٤,٦ مم	أبعاد العمود
A: 50 mM ammonium acetate, pH 4.6 B: 100 mM ammonium acetate, pH 6.8 Methanol (20: 80)	تركيب الطور المتحرك
الزمن (دقيقة): صفر ٣٠ ١٢ ٣٠ B% : صفر ٣٥ ٢٠ ٣٠	برنامج الاستخلاص التدريجي
١ مل / دقيقة	معدل سريان الطور المتحرك
UV عند طول موجة ٢٥٤	الكاشف

والكروماتوجرام التالي يبين تتابع ظهور مشتقات الـ PTC للأحماض الأمينية.



مميزات طرق HPLC

وقت الفصل يكون قصيراً، أكثر حساسية، ولا يحتاج الفصل الى درجة حرارة عالية No elevated temperature، ومع ذلك فإن طرق الـ HPLC لها عيوب.

عيوب طرق HPLC

تعتمد غالبية طرق فصل مشتقات الأحماض الأمينية على جزيئات السيليكا جيل الكروية Spherical silica gel المغطاة بطبقة من جزيئات عضوية ومرتبطة بروابط تساهمية. وهذه الطبقة تمثل الطور المعاكس Reversed phase وهي عبارة عن سلاسل هيدروكربونية تحتوى على ١٨ ذرة كربون (C18 alkyl chain).

المشكلة الأولى

تتمثل المشكلة الأولى في محدودية Limited تماثل النتائج باستخدام أعمدة HPLC خاصة في فصل الأحماض الأمينية. فمثلاً تختلف كفاءة الفصل من عمود لآخر نظراً لاختلاف طريقة تحضير العمود بالمصنع. هذا يعنى أنه عند تغيير العمود لابد من الضرورى إجراء التجارب على العمود الجديد ليعطى الفصل المناسب. وتظهر هذه المشكلة بوضوح لانخفاض فترة صلاحية Life time استخدام أعمدة الطور المخالف. ويلاحظ أنه تنتهى صلاحية استخدام أعمدة الـ HPLC بعد حقن عدة مئات قليلة من العينات وبالتالي لابد من إهمالها Dis-carde أو إعادة تنشيطها Regenerate. ويلاحظ أنه عند تكوين مشتقات للأحماض الأمينية تصبح أكثر كرها للماء Hydrophobic عما كانت عليه، وهذا يؤدي إلى فصل بواسطة الطور الكروماتوجرافى المعاكس Reversed phase ولكن من ناحية أخرى فإن الخاصية الكارهة للماء تقل بدرجة كبيرة الاختلافات

بين الأحماض الأمينية. بالإضافة إلى ذلك إذا احتاجت مشتقات الأحماض الأمينية إلى خطوة استخلاص فإن بعض الأحماض الأمينية يمكن فقدتها جزئياً. وهذا يؤدي إلى تغيير في تركيب محتوى الأحماض الأمينية وبالتالي الحصول على نتائج غير صحيحة.

المشكلة الثانية

تتمثل في المجاميع الفعالة الأخرى الموجودة في السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية فتكون الاستجابة قليلة لأحماض السيستئين، الليسين والهيدروكسي ليسين. أيضا يمكن للحمض الأميني الواحد أن يعطي أكثر من Peak بدلا من Peak واحد بسبب تكون مشتقات مختلفة.

المشكلة الثالثة

تتمثل في العينة نفسها Matrix of the sample. فمن النادر ما توجد عينة تحتوي فقط على أحماض أمينية ماعدا المخلوط القياسي للأحماض الأمينية. وقد تتداخل مكونات العينة مع الجواهر المستخدمة لتقدير مشتقات الأحماض الأمينية، وبالتالي نحصل على نتائج غير دقيقة.

سابعاً: آلية فصل الأحماض الأمينية باستخدام المبادلات الأيونية

ان استخدام المبادل الكاتيوني Cation exchanger (طور ثابت) مع تغيير في درجة حموضة pH المحلول المنظم (طور متحرك) فإنه يمكن فصل مدى واسع من الأحماض الأمينية، وهذه هي الفكرة الأساسية التي يعتمد عليها جهاز تحليل الأحماض الأمينية.

وفيما يلي توضيح أكثر لكروماتوجرافيا التبادل الأيوني :-

كروماتوجرافى التبادل الأيونى Ion-exchange chromatography

يعتمد الأساس فى هذا النوع الكروماتوجرافى على الانجذاب Attraction ما بين الشحنات المتضادة فى الجزيئات، حيث تحتوى العديد من المواد الحيوية مثل الأحماض الأمينية والبروتينات على مجاميع قابلة للتأين Ionizable.

وفى الحقيقة أنها تحمل محصلة شحنات Net charge إما موجبة أو سالبة، وتستخدم فى فصل مخاليط هذه المركبات. وتعتمد محصلة الشحنات لهذه المركبات على درجة حموضة محلول الوسط pH وكذلك على نقطة التعادل الكهربى للمركب. ويوجد نوعان من المبادلات الأيونية:

مبادل كاتيوني Cation ومبادل انيوني Anion.

تحمل المبادلات الكاتيونية مجاميع محملة بشحنات سالبة، وبالتالي تتجذب الى الجزيئات المحملة بشحنة موجبة. ويطلق فى بعض الأحيان على هذه المبادلات اسم المواد المبادلة للأيونات الحمضية -Acidic ion exchange materials، حيث أن الشحنات السالبة لها تنتج من تأين المجموعات الحمضية. تتجذب المبادلات الأنثيونية التى تحتوى على شحنات موجبة إلى الجزيئات المحملة بشحنة سالبة. ويستخدم اصطلاح المواد المبادلة للأيونات القاعدية Basic ion exchange materials حيث أن الشحنات الموجبة ناتجة من تأين المجموعات القاعدية.

نوع المبادل	المجاميع الفعالة	صفة التأين للمبادل	المبادل
مبادل أيونى حمضى	حامضية	سالب	كاثيوني
مبادل أيونى قاعدى	قاعدية	موجب	انيوني

توضع المبادلات الأيونية في أعمدة لفصل مخاليط أيونية. وفي حالة وجود طور متحرك يحتوى على أيونات العينة الذى يمر خلال عمود يحتوى على مبادل أيونى فيحدث توزيع تنافسى للأيونات ما بين المبادل الأيونى والطور المتحرك ويعتمد معدل تحرك الأيونات خلال العمود على تألفها النسبى Relative affinity، ويعتمد وقت الظهور R_f فى التحاليل التى تعتمد على المبادل الأيونى على عدة عوامل تشمل:-

- ١- حجم ونوع الشحنة فى أيونات العينة.
- ٢- درجة حموضة pH الطور المتحرك.
- ٣- التركيز الكلى ونوع الأيونات فى الطور المتحرك.
- ٤- وجود مذيبات عضوية مثل الميثانول فى الطور المتحرك.
- ٥- درجة حرارة العمود (درجة حرارة الأطوار الثابتة والمتحركة).
- ٦- معدل سريان الطور المتحرك.

والجدير بالذكر أن خاصيتى الأدمصاص والتوزيع تلعب دورا جزيئا Some Part فى الفصل باستخدام أعمدة المبادلات الأيونية. ولهذا فمن الصعب التنبؤ بسلوك أعمدة المتبادلات الأيونية فى بعض التحليلات، على العكس من الكروماتوجرافى السائل.

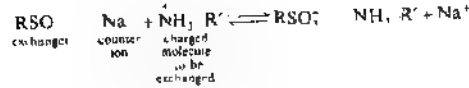
وتتم آلية التبادل الأيونى عن طريق خمس نقاط واضحة وهى:-

- ١- الانتشار الأيونى إلى سطح المتبادل. وتحدث هذه العملية بسرعة فى المحاليل المتجانسة.
- ٢- الانتشار الأيونى خلال تركيب جسم الـ Matrix المبادل إلى مواقع التبادل Exchange sit. وتعتمد هذه الخطوة على مدى الروابط العرضية

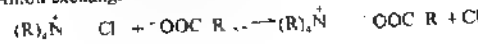
Cross linkage للمبادل وتركيز المحلول وهذه العملية هي أساس التحكم في مدى عملية التبادل الأيوني الكاملة بذاتها.

٣- تبادل الأيونات عند موقع التبادل، تحدث هذه العملية في الحال-Instantaneously ويتم خلالها الإتزان.

Cation exchanger



Anion exchanger



٤ - انتشار الأيون الذي تم مبادلته Exchanged خلال المتبادل إلى السطح.

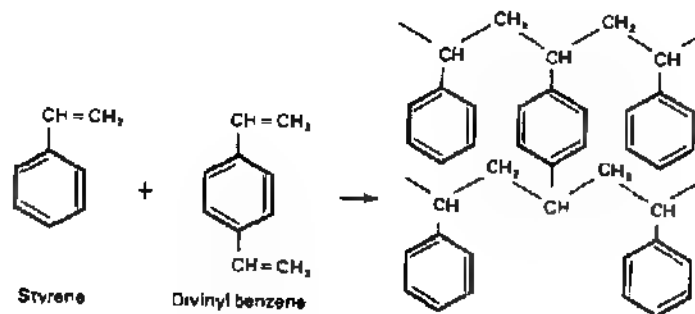
٥ - الذوبان الاختياري Selective desorption بواسطة المذيب ثم انتشاره إلى المحلول الخارجى. وتعتمد عملية الذوبان الاختياري للجزء المرتبط على التغيرات في درجة حموضة الوسط والتركيز الأيوني أو بواسطة تألف الاستخلاص Affinity elution.

٧-١- تحضير مواد التبادل الأيوني

توجد عدة مواد مبادلة للأيونات Ion-Exchanger تجاريا تستخدم بنجاح في فصل المواد الحيوية. وتحضر هذه المواد من الأستيرين مع ثنائى فينايل البنزين. ومركب عديد الأستيرين هو مركب عديد البلمرة، جزيئاته مرتبة في خط مستقيم Linear polymer ويذوب في العديد من المذيبات ويكون نتيجة لتكثف الأستيرين مع ثنائى فينايل البنزين، جزيئات لها روابط عرضية هي التي تجعل الراتنج غير ذائب.

وتعتمد درجة تكوين الروابط العرضية Cross linkage على النسب المختلفة من ثنائي فينايل بنزين والأستيرين فإذا كانت نسبة المكون الأول أعلى من الأستيرين فإنه يعطى مركب له روابط عرضية عالية.

والراتنجات ذات الروابط العرضية القليلة تسمح بنفاذ Permeable الجزيئات ذات الوزن الجزيء الكبير عن الراتنجات ذات الروابط العرضية لكثيرة. وعند إجراء السلفنة Sulphonation للروابط العرضية لعديد الأستيرين فإنه يعطى راتنج مسنفن Sulphonated polystyrene مثل Dowex 50 الذى هو متبادل حمضى قوى حيث تتأين مجموعة السلفونيك ($-SO_3H$) على مدى واسع من درجة الحموضة pH ماعدا درجة الحموضة المنخفضة جداً. ويحضر المبادل القاعدى القوى عن طريق تفاعل الروابط العرضية مع كلوروميثيل إيثر ثم تفاعل مجاميع الكلورو مع أمينات ثلاثية. والمجموعات $CH_2-N^+(CH_3)_3$ تتأين على درجات حموضة واسعة ماعدا درجة حموضة وسط عالية. وتماز جميع المواد المبادلة بأن لها سعة تبادلية كلية Total exchange capacity محددة، والتي تعرف بأنها عدد ملليمكافئات الأيونات القابلة للتبادل لكل جرام من المبادل أو لكل وحدة حجم من الراتنج الممتزج بالماء Hydrated resin وعلى ذلك فالسعة التبادلية للراتنج Bio-rad. AG-x4 تساوى ٢, ١ ملليمكافىء لكل سم^٣ وللمبادل DEAE- sephadex A2 له سعة تبادلية تساوى ٠,٥ ملليمكافىء لكل سم^٣, وفى بعض الأحيان يستخدم اصطلاح السعة المتاحة Available capacity للدلالة على السعة المتاحة لمركب معين مثل الهيموجلوبين، فالراتنج DEAE sephadex A25 له سعة متاحة للهيموجلوبين تقدر بـ ٠,٠٧ جم/ سم^٣ وتدل السعات لتبادلية على درجة الاستبدال للراتنج، ومن ثم تعطى وسيلة ارشادية على مدى مجال الاستخدام. ومن ذلك يتضح أن الراتنجات تختلف فيما بينهما تبعاً:



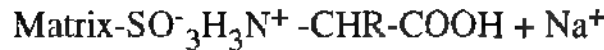
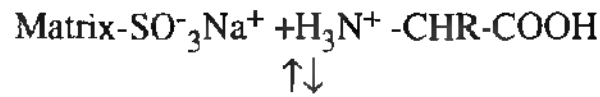
Co polymerization of styrene and divinylbenzene.

١ - حجم الجسيم Matrix

٢ - درجة الروابط العرضية.

٣ - درجة السلفنة.

يعبأ العمود بجزيئات صلبة من مادة سلفونات عديدة الأستيرين Sulpho-nate poly styrene سبق اتزانها Equilibrated مع محلول صودا كاوية. وفي هذه الحالة نجد أن مجموعات حمض السلفونيك تكون محملة كاملاً بكاتيون الصوديوم (Na^+). وهذه الصورة من الراتنج تعرف باسم الصورة الصوديومية Sodium form. ويمكن تحضير الراتنج في الصورة الهيدروجينية Hydrogen form عند غسيله بحمض. وتحدث عملية التبادل للأحماض الأمينية كما في المعادلات التالية:



ومن ذلك يتضح أن فصل الأحماض الأمينية يعتمد بصفة عامة على:

١ - اختلاف شحنات الأحماض الأمينية والذي يعتمد على قيم ثوابت الانقسام (pK) للسلاسل الجانبية (R).

٢ - تفاعل السلاسل الجانبية الكارهة للماء الخاصة بالمبادل الأيوني عديد الأستيرين مع الأحماض الأمينية. يضاف محلول حمضي ($\text{pH}=3.0$) من خليط الأحماض الأمينية إلى الراتنج في الصورة الصوديومية. وعند درجة الحموضة هذه فإن جميع الأحماض الأمينية تحمل شحنة موجبة، أي لا يحدث تبادل أيوني أو ارتباط، في حين تميل الأحماض الأمينية الكاتيونية Cation amino acids إلى أن تحل محل بعض أيونات

الصوديوم الموجودة في جزيئات الراتنج. وأن كمية الإحلال-Displace ment تختلف بدرجة قليلة Slightly بين الأحماض الأمينية المختلفة نظراً للاختلافات في درجة التأين.

فعند درجة حموضة ٣ فإن أغلب الأحماض الأمينية القاعدية (ليسين- أرجنين- هستدين) ترتبط بقوة مع الراتنج بواسطة قوى الكترولستاتيكية، وتستخلص عند درجة حموضة ٩-١١. بينما أغلب الأحماض الأمينية الحمضية (جلوتاميك- أسبارتيك) ترتبط بقوة ضعيفة فيحدث إحلال لها أولاً ثم يتبعها الأحماض الأمينية المتعادلة مثل لجليسين والفالين.

وحيث أن درجة حموضة محلول الإحلال Eluting solution ترتفع تدريجياً وكذلك تركيز كلوريد الصوديوم، فإن الأحماض الأمينية تتحرك إلى أسفل العمود بمعدلات مختلفة بحيث تكون في المقدمة الأحماض الأمينية الحمضية ثم المتعادلة ثم القاعدية. ويمكن جمعها على هيئة أجزاء صغيرة كثيرة Many small fractions والتي يجرى تقديرها كمياً بالتفاعل مع الننهيدرين. والشكل التالي (صفحتي ١١١، ١١٢) يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية.

من المعروف أن بعض الأحماض الأمينية تحمل شحنة سالبة (حامضية) والبعض الآخر يحمل شحنة موجبة (قاعدية) وأن درجة حموضة الوسط تلعب دوراً هاماً في اختلاف الشحنات على جزيئات الأحماض الأمينية- وفي حالة فصل الأحماض الأمينية بواسطة التبادل الأيوني يحدث ادمصاص عكسي Re-versible adsorption على جسم صلب Matrix مشحون (المتبادل الأيوني Ion exchanger) وتوجد بين الأحماض الأمينية والجسم الصلب اختلافات في قوة الإدمصاص حيث تستخلص Elute بعض الأحماض الأمينية بسرعة والبعض الآخر ببطء معتمدة على عدد الشحنات المتاحة في الأحماض الأمينية والجسم المختلف في نوع الشحنة.

١- فصل الأحماض الأمينية الحامضية
و الهيدروكسيلية

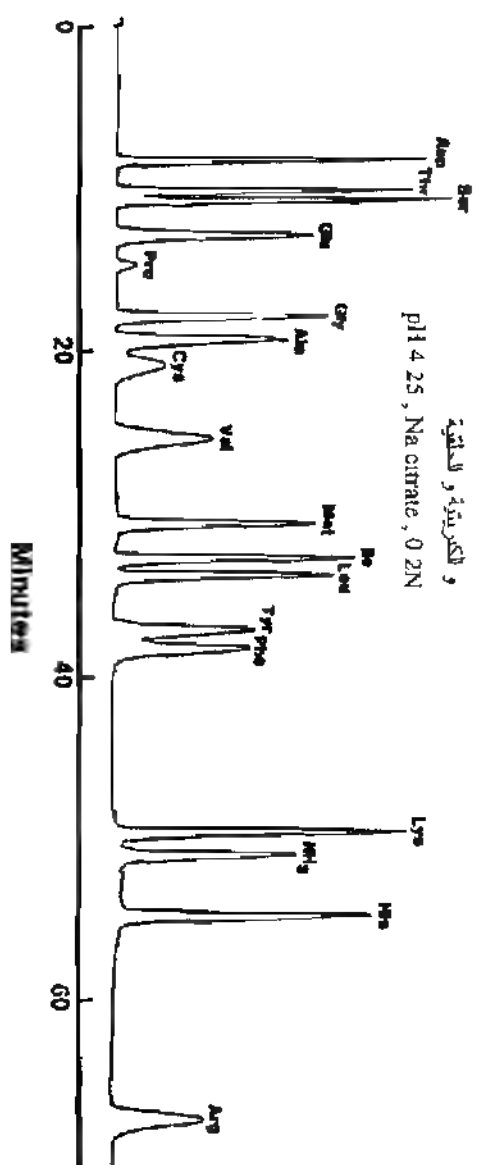
pH 3.25, Na citrate, 0.2N

٢- فصل الأحماض الأمينية المتعادلة
و الكبريتية و الحلقية

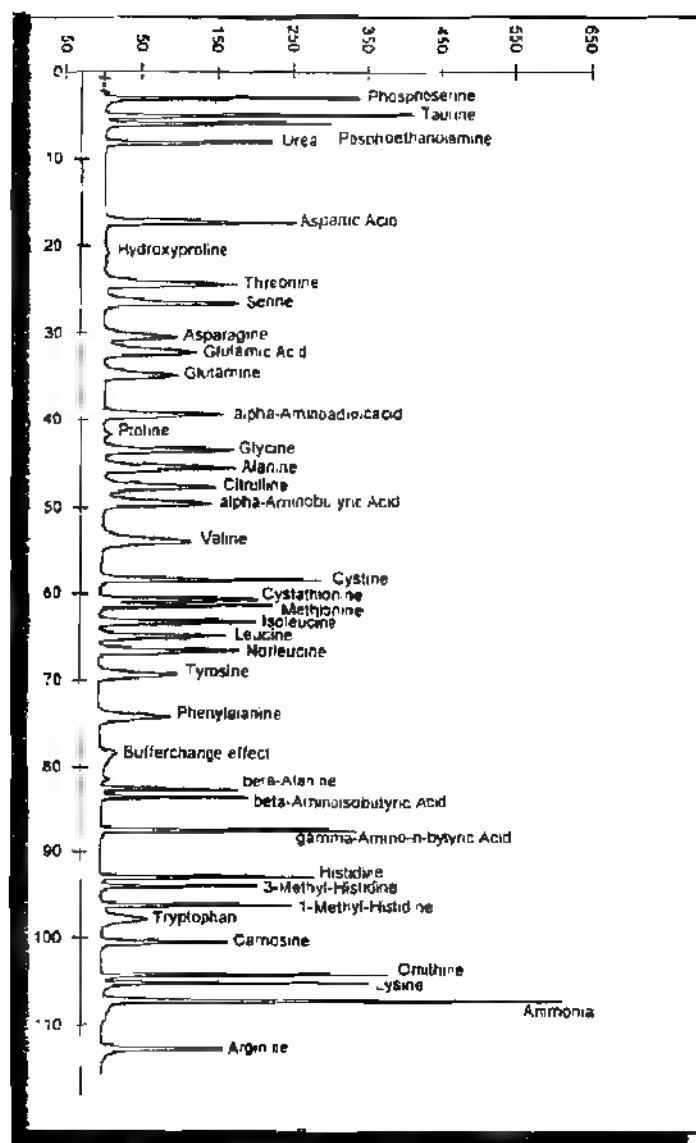
pH 4.25, Na citrate, 0.2N

٣- فصل الأحماض الأمينية القاعدية

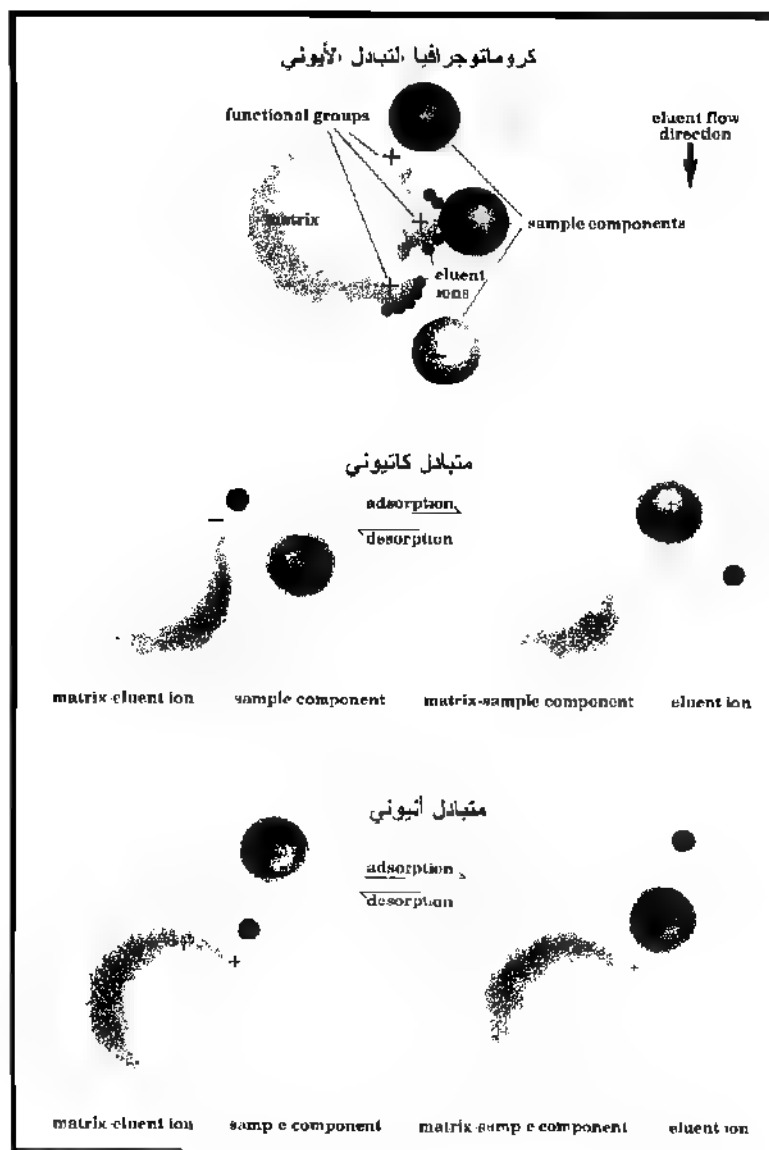
pH 5.28, Na citrate, 0.35N



كروماتوجرام يبين نتائج فصل الأحماض الأمينية
الناتجة من تحليل المائي للبروتينات



الكروماتوجرام التالي يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية وبعض المركبات الأمينية الموجودة عادة في السوائل الحيوية باستخدام محاليل منظمة سترات الليثيوم ذات درجات حموضة مختلفة.

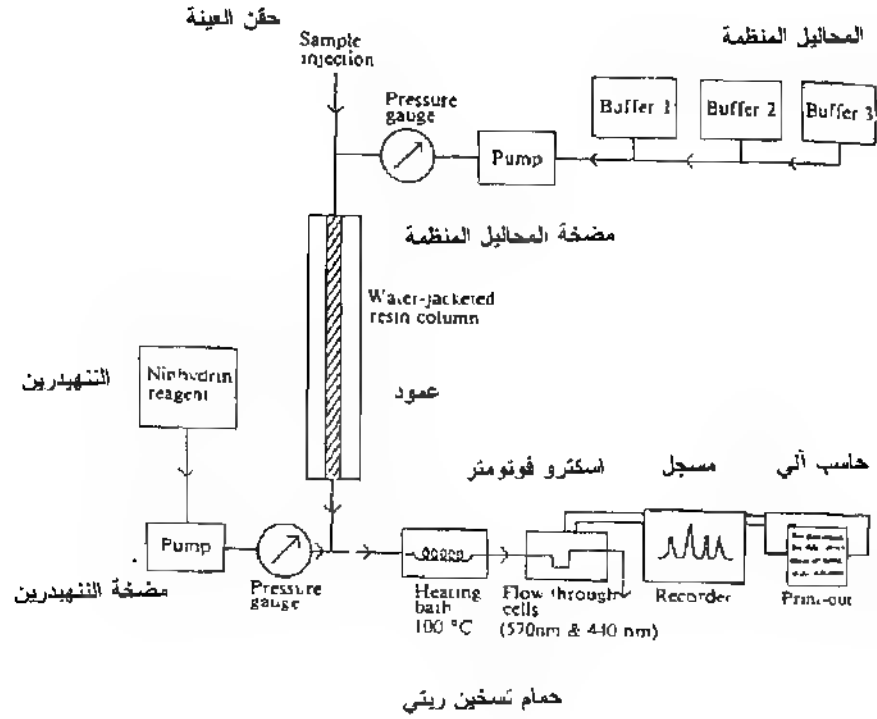


وفي حالة الإدمصاص العكسي Desorption فإن أيونات الطور المتحرك تتنافس مع الأحماض الأمينية في العينة المدمصة على الجسم الصلب المخالف في نوع الشحنة أو بمعنى آخر إن مكونات العينة المرتبطة على الجسم الصلب تتبادل مع أيونات الطور المتحرك الذي له نفس نوع الشحنة- تتم عملية الإدمصاص العكسي بالإستخلاص من نوع ايزوكراتيك Isocratic أى يستخدم طور متحرك ذو تركيب ثابت أثناء التحليل أو بطريقة أخرى أكثر شيوعاً وهي الإستخلاص المتدرج Gradient elution أى يتغير تركيب الطور المتحرك أثناء الفصل وهذه الطريقة لا غنى عنها Indispensable لفصل العينات الحيوية المعقدة.

والجدير بالذكر إن معظم المتبادلات الأيونية يمكن إستخدامها مرة أخرى Reusable بعملية الإسترجاع Regeneration أى التخلص من الأيونات المرتبطة أى يجرى استبدالها لإستعادة Restore الظروف لفصل آخر. وتجرى عملية الإسترجاع بواسطة محاليل منظمة ذات تركيز عالى ويلي عملية الإسترجاع اتزان للعمود Column equilibrium بإمرار المحلول المنظم الأول خلال العمود المسترجع.

ثامناً: جهاز تحليل الأحماض الأمينية Amino acid analyzer

تقدر الأحماض الأمينية وصفيّاً وكميّاً باستخدام عمود يحتوى على راتنج التبادل الأيونى ويمرر خلاله الطور المتحرك حاملاً معه الأحماض الأمينية المفصولة كل على حدة ثم يتفاعل مع الننهيدرين ويتكون معقد لونى. والجهاز يعتمد أساساً على ضخ Pumped محاليل منظمة تختلف في درجة حموضتها أو قوتها الأيونية Ionic strength خلال عمود الراتنج Resin column المزود بترموستات لضبط درجة حرارته. وقد حدث تطور في الجهاز باستخدام راتنجات



رسم تخطيطي لجهاز تحليل الأحماض الأمينية باستخدام النيهيدرين للتقدير الكمي

ذات نوعية عالية ونظام للحقن الآلى، مع أنظمة للكشف ذات حساسية عالية. وهذا أدى إلى تقليل وقت التحليل من أيام إلى ساعات. بالإضافة إلى تقديرها كميًا حتى وإن كان تركيز الأحماض الأمينية أقل من 10^{-9} مولر.

الشكل التخطيطي التالي يبين أجزاء جهاز تحليل الأحماض الأمينية وهي:-

١- محاليل منظمة ذات درجة حموضة مختلفة عادة يستخدم ثلاث محاليل منظمة ١، ٢، ٣ لها درجة حموضة ٢٥، ٣، ٤، ٢٨، ٥ على التوالي وتعمل كطور متحرك لإحلال الأحماض الأمينية.

٢- مضخة لدفع المحاليل المنظمة داخل العمود Buffer pump.

٣- وسيلة لحقن العينة Sample injection.

٤- عمود راتنج وبه وسيلة لضبط وثبات درجة حرارة الفصل Resin column.

٥- مضخة لدفع الجواهر الكشاف ننهيدرين Ninhydrin pump.

٦- حمام زيتى Reaction coil.

٧- خلية لتقدير انكثافه اللونية للمحلول Flow cell عند الطولين الموجين ٥٧٠ و ٤٤٠ نانوميتر.

٨- مسجل أو حاسب آلى Computer.

يتم الفصل داخل عمود يحتوى على مبادل كاتيوني قوى مثل (Sulphonated polystyrene resin) والذي له طبيعة تبادل أنيوني قوى $(-SO_3^-)$ وعند درجة الحموضة المنخفضة تحمل جميع الأحماض الأمينية شحنة موجبة وتنجذب إلى المجاميع السلفونية المحملة بالشحنة السالبة.

عند رفع درجة حموضة المحلول المنظم (الطور المتحرك) الذى يمر خلال العمود فإنه يحل Elute الأحماض الأمينية بمعدلات مختلفة حيث تنفصل الأحماض الأمينية بالتتابع على أساس قيم الـ PI لكل واحد منها. فعند درجة pH

٢,٥ (درجة حموضة الوسط التي يبدأ عندها الفصل) نجد أن الأحماض الأمينية التي تحتوي على مجموعة حامضية (-COOH) زائدة في سلاسلها الجانبية لها تألف قليل جداً مع المبادل وبالتالي هي أول الأحماض التي تخرج من العمود. عند نفس درجة حموضة الوسط المنخفضة (٢,٥) نجد أن الأحماض الأمينية التي تحتوي في سلاسلها الجانبية مجموعات قابلة للتأين والتي تحمل شحنة موجبة مثل الليسين والهستيدين ترتبط بقوة مع المبادل وتستخلص فقط من العمود عندما ترتفع درجة حموضة الوسط بدرجة كبيرة حيث تنخفض شحناتها الموجبة. يمتزج المحلول الخارج من العمود النيهيدرين (الجوهر الكشاف) ويسخن الخليط Effluent (محلول الحمض الأميني المفصول ومحلول النيهيدرين) على درجة ١٠٥° م حيث يظهر لون تقاس شدته عند الطولين الموجبين ٥٧٠ و ٤٤٠ نانوميتر.

ملخص لطريقة الفصل

١- يحقن خليط قياسي من الأحماض الأمينية وبعد إنتهاء التحليل يظهر تقرير يبين عدد الأحماض الأمينية القياسية R_f لكل حمض أميني ومساحات الـ peaks المقابلة للأحماض الأمينية.

٢- يزود الحاسب الآلي بالـ R_f لكل حامض اميني قياسي وتركيزه.

٣- يحسب ألياً معامل الاستجابة Response factor

بقسمة التركيز ÷ المساحة لكل حامض أميني

$$\text{Amount} / \text{area} = \text{RF}$$

تحقن العينة - يقوم الحاسب الآلي أوتوماتيكياً بكتابة تقرير يبين فيه اسم الحمض الأميني (من المعلومات السابق تغذيته بها)، الـ R_f ، التركيز بالـ nM حيث تضرب المساحة في معامل الاستجابة لكل حمض أميني.

٤- يحول تركيز الحمض الأميني من nM الى ng بالضرب في الوزن الجزيئي للحمض الأميني .

٥- يحسب تركيز الحمض الأميني على أساس % mg أو أى نوع آخر للدلالة على التركيز. يجب الأخذ فى الاعتبار أى تخفيف أجرى أثناء التحليل .

٨-١ ملاحظات عامة عن فصل الأحماض الأمينية

العمود Column

من المعروف أن قاعدة الـ Peak تتناسب طردياً مع الجذر التربيعى لطول العمود، فإن الأعمدة المستخدمة المصنوعة من الصلب غير القابل للصدأ والتي طولها ٢٠ سم ومعبأة بمبادل كاتيوني قوى تعطى Peaks ذات قواعد ضيقة، وقيم عالية لارتفاع الـ Peak. أى تفصل بوضوح الأحماض الأمينية ذات التركيب الكيميائي المتقارب.

المحاليل المنظمة Buffers

يجب إمرار تيار من النيتروجين لمنع وجود فقاعات فى المحاليل المنظمة أثناء سريانها، ويجب أن يكون التركيب ودرجة حموضة الوسط مضبوطة إلى ٠.٠١ مول/ لتر و ٠.١ وحدة pH. وفى حالة الأجهزة التى يستخدم فيها عمود واحد Single column فإن تتابع الفصل يعتمد على سلسلة من المحاليل المنظمة والتي ترتفع فيها درجة حموضة الوسط عن درجة حموضة محلول البداية (٢,٣) . ونستخدم سترات صوديوم أو سترات الليثيوم مصحوبة بمُنظف صناعى (Brij 35) ومادة مضادة للأكسدة (Thiodiglycol) ومادة حافظة (حامض الكابرليك) ويستخدم الاحلال المرحلى Stepwise elution وفيها تدفع المحاليل المنظمة خلال العمود لفترات مختلفة بالاعتماد على نوعية الأحماض الأمينية

المراد فصلها. والمحاليل المنظمة المستخدمة لها درجات pH ٣,٢٥، ٤,٢٥، ٥,٢٨، ١٠ سواء بتركيزات مولارية ثابتة أو متغيرة لفصل الأحماض الأمينية الحمضية والمتعادلة والقاعدية.

درجة الحرارة Temperature

يجب أن تكون درجة حرارة المبادل داخل العمود ثابتة حتى يمكن التغلب على التغيرات في درجة الـ pH للمحاليل المنظمة وأيضا تأين الأحماض الأمينية. وبصفة عامة فإن زيادة درجة الحرارة تؤدي إلى سرعة الإحلال وإلى تغير نسبي في موضع الحمض الأميني الذي يجرى إحلاله وبالتالي يؤدي إلى صعوبة تفسير النتائج. وعادة درجة الحرارة المختارة هي ٦٠°م ومع ذلك فإن درجات الحرارة الأقل من ذلك تكون مطلوبة في بعض الأحيان لفصل الأحماض الأمينية المتقاربة في التركيب الكيميائي.

معدل السريان Column flow rate

يتطلب الفصل الناجح والحصول على نتائج متطابقة بتكرار التقدير أن يكون معدل سريان المحلول المنظم ثابتاً باستخدام ضغط ثابت أو مضخة دفع ثابتة. ويصمم هذا النوع من المضخات بأن تدفع المحاليل المنظمة بمعدل ثابت. ويعتمد اختيار معدل السريان على أساس نوع المبادل الكاتيوني وأبعاد العمود.

تحضير العينة Sample preparation

يختلف حجم العينة المحقون داخل العمود على حسب أنواع الأجهزة المتوفرة تجارياً. ففي حالة الأجهزة القديمة يتطلب حجم كبير من العينة (١ مل) نظراً لحساسيتها القليلة. وفي حالة الأجهزة الحديثة تحقق حجوماً قليلة، عادة ٥٠ ميكرو لتر أو أقل. ويجب معرفة أن تحضير العينة المضبوط يؤدي إلى الحصول

على نتائج متطابقة وهذا يعتمد على طبيعة العينة ومكوناتها. ويجب أن يكون محلول العينة المحقون نظيفا خال من البروتينات والجزئيات الأخرى الكبيرة. وفي حالة الفشل للوصول إلى هذه المتطلبات فإنه يؤدي إلى انسداد الفلتر Frit الموجود أعلى عمود المبادل الكاتيوني، وبالتالي يصبح من الضروري التخلص من المبادل وتنظيف وإعادة تعبئة العمود مرة أخرى، وهي خطوات شاقة. وبصفة عامة فإن العينات السائلة Liquid يلزم لها فقط عملية ترشيح أو طرد مركزي وإزالة البروتينات Deproteinization فإنه يلزم ترسيبها بواسطة حمض البكريك أو حمض سلفوساليسليك أو باستخدام (الفرز الغشائي) Dialysis أو الترشيح الفوقى. وفي حالة العينات الصلبة Solid مثل الأنسجة النباتية أو الحيوانية أو الأطعمة فإنه يتطلب التجانس فى الاستخلاص والتخلص من البروتينات. وفي حالة الببتيدات والبروتينات فإنه يلزم إجراء التحليل المائى.

أولا: للحصول على الأحماض الأمينية الحرة.

يجب عند حقن العينة أن تكون مذابة فى محلول منظم ذو درجة حموضة ٢,٢ قبل بدأ فصل الأحماض الأمينية، وبعد عملية فصل واحلال جميع الأحماض الأمينية فإنه يلزم إجراء عملية إسترجاع Regeneration للمبادل الكاتيوني قبل حقن العينة التالية بإمرار محلول صودا كاوية ذو درجة حموضة ١٠. وفي الأجهزة الحديثة فإنه يتم الحقن آليا بعد تمام تحليل العينة السابقة وضخ المحلول المنظم من البداية للعينة التالية.

الكشف Detection

تعمل المصنخة الثانية بالجهاز على ضخ معدل ثابت من الجواهر الكشاف ليقابل المحلول الخارج من العمود، وعند تمام التفاعل فإنه تقاس الكثافة اللونية باستخدام خلية Flow cell بواسطة جهاز تقدير الألوان أو قياس الفلورة Fluo

rimeter. وعادة يستخدم الجوهر الكشاف الننهيدرين بعد أن يمر على ملف يسخن في حمام زيتي على درجة ١٠٠°م. ويتعين الامتصاص على طولين موجيين ٥٧٠ و ٤٤٠ نانوميتر للأحماض الأمينية والأيمينية على التوالي. يذاب الننهيدرين في ايثيلين جليكول (خال من البيروكسيدات) وأحادي ميثايل إيثر (ميثيل سيليلوسولف Methyl cellosolve) باستخدام محلول منظم الخلايا عند درجة حموضة ٥,٥. ويمرر تيار من النيتروجين أثناء تحضير الجوهر الكشاف للتخلص من الهواء، وتضاف كمية قليلة من مادة مختزلة مثل كلوريد القصيدروز أو كلوريد التيتانوس Titanous chloride بحيث تكفي لتكوين كمية معينة من الننهيدرين المختزل. ويكون لون الجوهر الكشاف ذو لون أصفر فاتح، ويجب تخزينه في زجاجة بنية وتحت ضغط من النيتروجين نظراً لأن الننهيدرين حساس للضوء والأكسجين.

يحتاج تفاعل الننهيدرين إلى حرارة ولذلك يمر خليط المحلول الخارج من العمود وجوهر الننهيدرين خلال ملف Reaction Coil من التفلون ذو قطر صغير (١ مم) ويظل على درجة حرارة ١٠٠°م في حمام زيتي. ويجب التأكد من أن السريان غير معاق، حيث أن الحرارة الزائدة تؤدي إلى ترسيب الننهيدرين في الملف ذو القطر الضيق مما يؤدي إلى إغلاق الجهاز تماماً Stoppage.

وهناك بعض الأجهزة الحديثة تعتمد على استخدام تفاعل الفيثالدهيد، وهو يشابه تقريباً تفاعل الننهيدرين في كثير من الأحوال. فمثلاً الجوهر الكشاف الفيثالدهيد ثابت وهو يذوب في الماء وبالتالي يمكن الاستغناء عن الكيماويات السامة مثل التي تستخدم في تحضير الننهيدرين، كما لا يحتاج الأمر إلى التخزين في جو من النيتروجين. ونظراً لأن تفاعل الفيثالدهيد يحدث بسرعة عند درجة حرارة الغرفة فإن الأمر لا يحتاج إلى التسخين على درجة ١٠٠°م في الحمام الزيتي وبالتالي يمكن التغلب على المشاكل المتعلقة بهذه النقطة. ونظراً

لزيادة الحساسية باستخدام تفاعل الفينالدهيد، فإنه يمكن الكشف عن تركيزات من الأحماض الأمينية تصل إلى البيكومول (10⁻¹²) picomol.

٨-٢- تقدير الأحماض الأمينية كميًا Quantitation

تختلف كثافة اللون أو الفلورة الناتجة من مول واحد من الحمض الأميني اختلافًا قليلًا جدًا تبعاً لنوعية الأحماض الأمينية. ولهذا ينتج عن حقن مخلوط من الأحماض الأمينية الذي يحتوي على تركيزات متساوية من كل حمض أميني (٢٠٠ نانومول/ مل) مساحات متساوية من الـ Peaks.

يجب استخدام مادة قياسية داخلية Internal standard لكل عملية تحليل، وهذه المادة هي عبارة عن حمض أميني غير موجود في العينة التي يجري تحليلها. فمثلاً عند تحليل عينة بلازما الدم يستخدم نورليوليسين أو ألفا أمينو بيتا جوانيدينو حمض البيوتيريك كمادة قياسية داخلية ويجب أن تضاف بتركيز معلوم إلى العينة قبل تجهيزها وتحليلها. وعند معرفة كمية المادة القياسية فإنه يمكن معرفة تركيز الأحماض الأمينية في العينة عن طريق معرفة مساحات الـ peaks للمادة القياسية والعينة. وفي هذه الطريقة يمكن التغلب على المشاكل التي تنشأ من فقد كمية من العينة أثناء التحضير. وكذلك اختلاف الكثافة اللونية للمحاليل المحضرة مثل الننهيدرين وكذلك التغيرات في ظروف التحليل.

ويمكن حقن خليط من الأحماض الأمينية معلوم تركيز كل حمض أميني كل على حدة (External standard) ومنه يمكن حساب كمية أي حمض أميني في العينة من الحسابات التالية:-

أولاً: استخدام محلول خليط الأحماض الأمينية القياسية
عند حقن كمية معلومة من هذا الخليط فإنه يمكن استنتاج حسابياً معامل
الاستجابة (RF) Response factor لكل حمض أميني بمعرفة تركيز الحمض
ومساحة الـ peak الخاص به .

$$\text{معامل الاستجابة (RF)} = \frac{\text{التركيز}}{\text{مساحة الـ peak}}$$

ثانياً: يعرف تركيز الحامض الأميني بعد حقن العينة من المعادلة التالية:-

$$\text{التركيز} = \text{مساحة الـ peak} \times \text{معامل الاستجابة} .$$

تاسعاً: تطبيقات عامة علي تحليل الأحماض الأمينية Applications

٩-١: استخدام تركيب الأحماض الأمينية لتتبع نضج البذور

المثال التالي يبين تركيب الأحماض الأمينية لبذور الفلفل في تتبع مراحل نضج قرون الفلفل (أخضر- خضر مخطط بلون أحمر- أحمر) .

الحمض الأمينى	بذور الفلفل		
	ثمار خضراء	ثمار خضراء مخططة بلون احمر	ثمار ناضجة حمراء
ليسين	٣,٢٥	٣,٨٣	٤,٣٤
هستيدين	١,١٤	١,٦٥	١,٨٠
أرجنين	٣,٣١	٦,٥١	٨,١٨
اسبارتيك	٩,٣٦	٨,٥٠	٨,٩٥
ثريونين	٢,٨٤	٣,٣٧	٣,٧٥
سيرين	٣,٢٩	٤,٢٨	٤,٦٠
جلوتاميك	١٠,٧٩	١٣,٨٤	١٦,٢٧
برولين	٢,٤٧	٣,٣٠	٣,٦٦
جليسين	٢,٨٣	٣,٢٨	٤,٤٧
آلانين	٢,٩٥	٣,٦٩	٤,٠٧
فالين	٣,٠٤	٣,٧٤	٤,٢٣
ميثونين	٠,٩٣	١,١٠	١,٢٨
أيزوليوسين	٢,٤١	٢,٩١	٣,٣٢
ليوسين	١,٠٨	٤,٩٧	٣,٦٩
تيروزين	١,٤٩	١,٨٣	٢,٢١
فينايل آلانين	٢,٥٩	٣,٤٩	١٠,٦

يظهر هذا الجدول زيادة في كميات الأحماض الأمينية لبذور الفلفل خلال فترات النضج وبصفة خاصة أحماض الأرجنين والجلوتاميك مما يبين أهمية هذين الحمضين في تكوين بعض الأحماض الأمينية الأخرى بالإضافة الى تكوين الأحماض النيكلوتيدية وبعض القواعد الأميدية (Farag et. al. 1982).

٢-٩- استخدام تركيب الأحماض الأمينية في تمييز الجنس

يبين المثال التالي تركيب الأحماض الأمينية في أوراق نباتي الباباظ والجوجوبا المذكورة والمؤنثة.

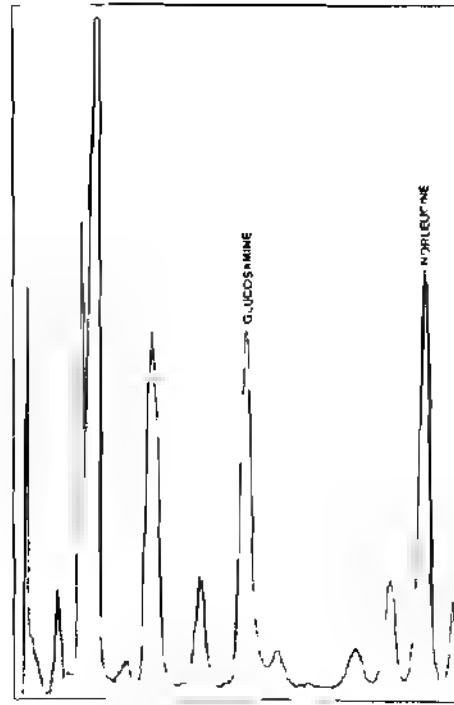
الحمض الأميني	أوراق نبات الجوجوبا		أوراق نبات الباباظ	
	المؤنثة	المذكورة	المؤنثة	المذكورة
اسبارتيك	٠,٢٠	٠,٣٢	١,٥٤	١,٩٠
ثريونين	٠,٠٥	٠,٠٦	٠,٣٠	٠,٥٢
سيرين	٠,٠٨	٠,١٣	٠,٤٠	٠,٤٦
جلوتاميك	٠,٢٠	٠,٣٤	١,٠٨	١,٢٤
برولين	٠,٠٨	٠,١٣	٠,٣٦	٠,٣٩
جليسين	٠,١٣	٠,٢٥	٠,٥٦	٠,٦٣
آلانين	٠,٠٣	٠,١٨	٠,١٢	٠,١٥
سستين	—	٠,٠١	—	٠,١٧
فالين	٠,٠٤	٠,٦٧	—	٠,٠٢
ميثونين	٠,٠١	٠,٠٢	٠,١٦	٠,١٦
أيروليوسين	—	—	—	—
لبوسين	٠,٠٣	٠,٠٧	٠,٣٢	٠,٣٤
تيروزين	٠,١٣	٠,١٢	٠,٤٣	٠,٥٠
فينايل آلانين	٠,٠٢	٠,١٦	٠,١٨	٠,٢٢
هستيدين	٠,٠٩	٠,٠٣	٠,٧٥	٠,٥٥
ليسين	—	٠,٠٩	—	—
أرجنين	٠,٠٧	—	٠,٢٨	٠,٢٣

تظهر النتائج السابقة أن أوراق نبات الجوجويا المؤنثة تتميز بوجود حمض الستين وغياب الأرجنين بالمقارنة بأوراق الجوجويا المذكرة بينما أوراق الباباظ المؤنثة تتميز بوجود أحماض الستين والفالين التي لا توجد في أوراق النباتات المذكرة وبصفة عامة فإن الأوراق المؤنثة في النباتين تحتوى على كميات أكبر من الأحماض الأمينية الموجودة بالأوراق المذكرة (Farag et. al., 1987).

٤-٣- الكشف عن تلوث الطعام بالسموم الفطرية

إن احتواء الأطعمة على مكونات فطرية يسبب مخاطر على صحة الإنسان نتيجة لوجود السموم الفطرية. توجد طريقة لمعرفة وجود الفطريات وهي طريقة هاورد للعد الميكروسكوبى Haward Mould Count إلا أن هذه الطريقة تحتاج إلى تدريب خاص وخبرة فى إستخدام الميكروسكوب وحديثاً وضعت طرق تحليلية تعتمد على تقدير الشيتين Chitin الذى هو متبلر من S-1,4-N-acetyl glucose amine linked ومن المعروف أن مركب الشيتين هو أحد مكونات الجدار الخلوى للفطر وعلى ذلك يمكن استخدام هذا المركب كدليل Indicator على التلوث الفطرى فعند إجراء التحليل المائى الحامضى للشيتين فإنه ينتج جلوكوزامين الذى يمكن بسهولة الكشف عنه وتقديره كمياً بواسطة جهاز تحليل الأحماض الامينية كما فى الكروماتوجرام بصفحة (١٢٧).

والطريقة المثلى للحصول على أعلى تركيز من الجلوكوز أمين هو إجراء تحليل مائى للعينة تحت مكثف عاكس بإستخدام ٦ ع حمض هيدروكلوريك لمدة ٢-٤ ساعات على درجة ١١٠°م- ووجدت علاقة خطية بين كمية الفطر وتركيز الجلوكوز أمين (Cousin et.al., 1984).



(كروماتوجرام يبين عينة طماطم ملوثة بفطر)

٩-٤- التقييم الغذائي لبعض البذور seeds والنقل nuts

يتم هذا التقييم عن طريق استخدام المقياس الكيميائي Chemical score كدليل على القيمة الغذائية للبروتين Nutritional value.

يتم ذلك بمقارنة نموذج Pattern الأحماض الأمينية الأساسية Essential بعد التحليل المائي لعينة الطعام بنموذج الأحماض الأمينية اللازم لاحتياج الإنسان الحقيقي Real human need والذي يسمى النموذج المرجعي أو المثالي Ideal or reference pattern مثل لبن الإنسان و بروتين البيض.

ويحسب المقياس الكيميائي على أساس أنه النسبة بين تركيز الحمض الأميني المحدد في العينة إلى تركيز الحامض الأميني المقابل له في البروتين المرجعي (مجم حمض أميني/ جرام بروتين) ثم الضرب في ١٠٠.

لذلك يتبع الخطوات التالية لحساب المقياس الكيميائي.

١ - حسب تركيز الحمض الأميني الأساسي على أساس مجم/ جم بروتين العينة ويعطى له الرمز (a)

mg amino acid/ 1 g sample protein (a)

٢ - قسمة (a) على تركيز الحمض الأميني القياسي المقابل له في البروتين المرجعي.

mg amino acid in sample protein/ mg amino acid in reference protein

٣ - يعين الحمض الأميني المحدد (اللازم لتخليق البروتينات) وهو الذي يوجد بأقل نسبة بالمقارنة بجميع نسب الأحماض الأساسية.

٤ - يحسب المقياس الكيميائي للدلالة على القيمة الغذائية للبروتين بضرب تركيز الحماض الأميني المحدد $\times 100$.

وبعبارة أخرى فإن الحمض الأميني الذي به نقص Deficient عن احتياج الإنسان هو الحمض الموجود بتركيز أقل من الحمض الأميني المناظر الموجود في ابروتين المرجعي ويسمى الحمض الأميني الناقص Deficient amino acid. الحمض الاميني الذي يوجد بأقل نسبة يسمى الحمض الاميني المحدد Limiting amino acid، أي عند قسمة تركيزات جميع الأحماض الأمينية الأساسية في العينة على التركيزات المقابلة من الأحماض الأمينية في البروتين المرجعي فإن أقل نسبة لحمض أميني معين هو الحمض الأميني المحدد.

لتعيين الأحماض الأمينية التي يقل تركيزها عن الأحماض الأمينية في البروتين المرجعي (الناقصة Deficient) والأحماض الأمينية المحددة ثم Chemical score (C.S) في بروتين فول الصويا والقمح يتبع الخطوات التالية:-

- يقسم تركيز كل حمض أميني في العينة على تركيز الحمض المقابل في البروتين القياسي FAO، يتبين أن أقل نسبة هي (٢٩ ÷ ٣٥) ٠,٨٣ لمجموع الحمضين الأميين سستئين ومثيونين في بروتين فول الصويا وبالتالي يعتبر هذان الحمضان هما العاملان المحددان، وأن C.S هو ٨٣ (٠,٨٣ × ١٠٠) لبروتين فول الصويا. ولا توجد أحماض أمينية ناقصة Deficient، أي التي يكون تركيزها أقل عن التركيز المقابل في الأحماض الأمينية للبروتين المرجعي.

تركيز الأحماض الأمينية الأساسية لبعض البروتينات (مجم/ جم بروتين)

الحمض الأميني الأساسي	الببيض	لبن الإنسان	بروتين مرجعي طبقاً لـ FAO (أ)	القمح (ب)	ب/أ	فول صويا (ج)	ج/أ
ثريونين	٤٧	٤٥	٤٠	٣٣	٨٢,٥	٤١	١,٠٥٢
سستئين + ميثيونين	٥٧	٣٥	٣٥	٣٦	١,٠٢٨	٢٩	٠,٨٢٨
فالين	٦٦	٥٤	٥٠	٤٧	٩٤	٥٠	١,٠٠
إيروليوسين	٥٤	٤٧	٤٠	٣٧	٩٢,٥	٤٥	١,٢٥
ليوسين	٨٦	٩٥	٧٠	٧٢	١,٠٢٨	٧٦	١٠,٨٥
تيروزين + فينيل آلانين	٩٣	٧٢	٦٠	٨٦	١,٤٣٣	٩٣	١,٥٥
هستيدين	٢٢	٢٦	-	٢٥	-	٢٧	-
ليسين	٧٠	٧٠	٥٥	٣٢	١,٥٨١	٦٥	١,٠١٨١
تريبتوفان	١٧	١٧	١٠	١٤	١,٤	١٣	١,٣
المقياس الكيميائي			١٠٠	٥٨	-	٨٣	

حمض أميني ناقص التركيز Deficient

حمض أميني محدود Limiting

- وب نفس الطريقة في حالة القمح يتبين أن الحمض الأميني ليسين هو المحدد وأن الـ C.S لبروتين القمح هو $(32 \div 55 \times 100) = 58$ وأن الأحماض الأمينية الناقصة Deficient هي الثريونين، فالين، ايزوليسين هذا بالإضافة الى الليسين. وطبقا لتقارير الهيئات العلمية العالمية الخاصة بالتغذية والصحة (WHO/FAO) فإن تركيز كل حمض أميني أساسي (جم حمض أميني أساسي / ١٠٠ جم بروتين) اللازم لتغذية الإنسان هي كما يلي:-

الحمض الأميني الأساسي	التركيز (مجم/جم بروتين)	التركيز (مجم/١٠٠ جم بروتين)
ليسين	٥٥	٥,٥
ميثيونين + سستئين	٣٥	٣,٥
ثريونين	٤٠	٤,٠
أيزوليوسين	٤٠	٤,٠
ليوسين	٧٠	٧,٠
فالين	٥٠	٥,٠
فينايل ألانين + تيروسين	٦٠	٦,٠
تريوتوفان	١٠	١,٠
هستيدين	٢٦	٢,٦

والمثال التالي يبين أيضا كيفية معرفة الأحماض الأمينية المحددة والمقياس الكيميائي للبروتين في نباتي الحمص والفول.

أولاً: تركيب الأحماض الأمينية (جم / ١٠٠ جم بروتين) في نباتي الفول والحمص.

تركيب الأحماض الأمينية	البروتين المرجعي R (جم %)	الحمص		الفول	
		S ₁ /R	تركيز (جم %) S ₁	S ₂ /R	تركيز (جم %) S ₂
أسبارتيك	—	—	١١,٦	—	١١,٢
• ثريونين	٤	١٠,٨٥ أ	٣,٤	٠,٧٥ ب	٣,٠
سيرين	—	—	٤,٨	—	٤,٦
جلوتاميك	—	—	١٧,٨	—	١٨,٣
برولين	—	—	٤,٣	—	٤,٢
جليسين	—	—	٣,٩	—	٣,٧
آلانين	—	—	٤,١	—	٤,١
• فالين	٥	٠,٨٦ ب	٤,٣	٠,٩٨ ج	٤,٩
أيزوليوسين	٤	١,١٥	٤,٦	١,١	٤,٤
• ليوسين	٧	١,٠٩	٧,٦	١,١	٧,٧
• تيروزين	٦	١,٣٨	٢,٨	١,٤٢	٢,٩
• هيناييل آلانين	—	—	٥,٥	—	٥,٦
• ليسين	٥,٥	١,١١	٦,١	١,١٥	٦,٣
هستيدين	٢,٦	٠,٩٢	٢,٤	١,٠	٢,٦
أرجنين	—	—	٩,١	—	٦,٨
• ميثيونين	—	٠,٩٤ ج	١,٧	١٠,٦٠ أ	١,٤
• سستين	٣,٥	—	١,٦	—	٠,٧
• تريتوفان	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠

تمثل النسبة S/R خارج قسمة تركيز الحمض الأميني في العينة على تركيز الحمض الأميني المقابل في البروتين المرجعي.

تمثل الحروف أ، ب، ج الأحماض الأمينية المحددة الأولى والثانية والثالثة على التوالي
تدل العلامة • على الحمض الأميني الأساسي.

ثانياً: تعيين الأحماض الأمينية المحددة والمقياس البروتيني لبعض البقوليات

المصدر النباتي	المقياس البروتيني	الأحماض الأمينية المحددة		
		الأول	الثاني	الثالث
٨٥	٨٥	ثريونين	فالين	ميثيونين + سستين
٦٠	٦٠	ميثيونين + سستين	ثريونين	فالين

وهناك مقياس آخر لمعرفة القيمة الغذائية لأي مادة غذائية وهو مقارنة كمية كل حمض أميني أساسي (A) منسوبا الى الكمية الكلية للأحماض الأمينية الأساسية (E) أي النسبة A:E.

٩-٥ تقييم بروتين الأغذية Evaluation of food protein quality

يعتمد هذا التقييم على مقياس الحمض الأميني Amino acid score (يعتمد على كمية حمض أميني واحد وهو الحمض الأميني المحدد) ويؤخذ في الاعتبار معامل نصحيح وهو الهضم لحقيقي للبروتين Protein true digestability الذي يقدر بطريقة ميزان الفأر Rat balance.

ولتقييم كمية الأحماض الأمينية المناسبة Adequacy في أغذية الأطفال فإنه تستخدم طريقة تعتمد على نوعية وكمية البروتين، ولذلك يستخدم اصطلاح معدل الحمض الأميني Amino acid rating وهو يستنتج من حاصل ضرب مقياس الحمض الأميني × النسبة المئوية كما في المعدلة

$$\text{Amino acid rating} = \text{Amino acid score} \times \text{protein (g/100 kcal)}$$

ويستنتج اصطلاح آخر وهو معدل الحمض الأميني النسبي لتقدير مدى نوعية أغذية الأطفال من المعادلة التالية:-

$$\text{Relative amino acid rating} = \frac{\text{Amino acid rating of test formula} \times 100}{\text{Amino acid rating of human milk}}$$

يبين المثال في صفحة ١٣٤ كيفية حساب المقياس الكيميائي ومعدل الحمض الأميني في عيّنتين (مسحوق ٢٠١ وسائل ٢٠١) .

٦-٩ تأثير التركيب الفراغي للأحماض الأمينية على القيمة الغذائية للبروتين

من المعروف أن كل حمض أميني يحتوي على ذرة كربون غير متناصفة asymmetric وبالتالي فإنه يوجد في صورتين متشابهتين وهما اليسارية (L) واليمينية (D) وتسمى Enantiomers وبصفة عامة فإن الأحماض الأمينية اليسارية تتحد مع بعض وتكون ببتيديات وبروتينات لها خواص تركيبية ووظيفية عن طريق انزيمات البلمرة- تتحول الأحماض الأمينية اليسارية الى اليمينية تحت ظروف تصنيع الغذاء وبصفة خاصة تحت تأثير الحرارة والوسط القلوي Amino acid racemization وكذلك بواسطة إنزيمات بعض الكائنات الدقيقة مثل إنزيمات الأكسدة Oxidases ، نقل مجموعة الأمين Transaminases ، إنزيمات لتشابه Racemases- ويلاحظ أن البروتينات التي تحتوي على أحماض أمينية يمينية تتحلل إنزيميا بسرعة أقل عن البروتينات المحتوية على الأحماض الأمينية اليسارية- كما أن نواتج التحليل المائي للبروتينات اليمينية تقلل من قيمتها الغذائية Nutritional quality وأيضاً من سلامة وأمان الطعام Food safety حيث تتكون مركبات غير قابلة للتمثيل الغذائي -nonaetaboliza- ble D- ,D-L, L-D-D وهذه الروابط غير قابلة جزئياً أو كلياً للتحلل بإنزيمات

حساب المقياس الكيميائي ومعدل الحمض الأميني في عينتين (مسحوق ١، ٢ وسائل ١، ٢)

مقياس الحمض الأميني (%)	فالين	تريثوفان	ثريونين	فينايل الانين + مستكين	ميثيونين + مستكين	ليسين	ليوسين	أيزوليوسين	هستيدين	التركيبية
٦٣	٤,٨٣	١,٠٨	٣,٦٨	٩,١٦	٢,٩٦	٥,٥٦	٨,٠٦	٤,٧٧	٢,٧٥	مسحوق (١)
٧١	٤,٧٨	١,٣٢	٣,٧٠	٨,٧٣	٢,٩٨	٥,٢٨	٧,٨٩	٤,٦٦	٢,٧٢	سائل مركز (١)
٨١	٤,٦٨	١,٤٨	٣,٨٩	٨,٩١	٣,٤٨	٥,٣٢	٧,٦١	٤,٤٩	٣,٣٩	مسحوق (٢)
٧٠	٤,٨٥	١,٢٠	٣,٦٧	٨,٥١	٣,٢٢	٥,٧٠	٧,٧٤	٤,٦٥	٤,٤٥	سائل مركز (٢)
	٥,٥	١,٧	٤,٣	٧,٢	٤,٢	٦,٦	٦,٣	٤,٦	٢,٦	لبن الانسان

في حالة التركيبية رقم (١) تم حساب :

١- الحمض الأميني الأقل نقصا بقسمة الحمض الأميني في

التركيبية (١) على مثيله في لبن الانسان (البروتين

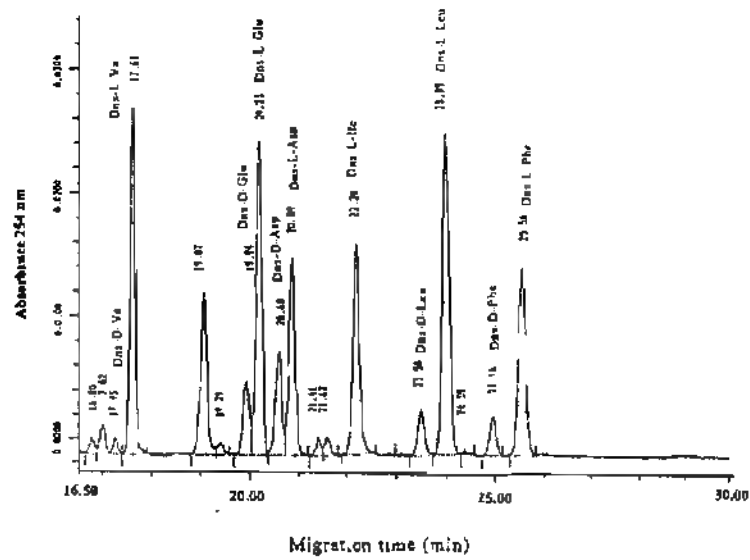
المرجعي) وكانت النسب

٠,٨٨، ٠,٦٤، ٠,٨٦، ١,٢٧، ٠,٧٠، ٠,٨٤، ١,٠٤، ١,٠٦

ب- مقياس الحمض الأميني = $١٠٠ \times ٠,٦٤ = ٦٤$

ج- معدل الحمض الأميني (مقياس الحمض \times كمية البروتين) = $٢,٦ \times ٠,٦٤ = ١,٧$

د- المعدل النسبي = $١,٦٦ \div ١,٥ \times ١٠٠ = ١١٠,٦٧$



فصل متشابهات الأحماض الأمينية بعد تحويلها إلى مشتقات الدانسيل ويلاحظ أن وقت ظهور المتشابه اليميني أقل من المتشابه اليساري للحمض الأميني (Chang et al., 1999).

التحليل المائي للبروتينات العادية ونتيجة لوجود أجهزة HPLC, GC وأعمدة لها القدرة على فصل المتشابهات Chiral columns أمكن فصل المتشابهات اليمينية عن اليسارية للأحماض الأمينية- والكروماتوجرام فى صفحة ١٣٥ يوضح تتابع فصل متشابهات الأحماض الأمينية.

٧-٩- دراسة تأثير المعاملات الصناعية على القيمة الغذائية للبروتين

- تؤدى المعاملات التكنولوجية (الحفظ- التخزين- الإضافات الغذائية) الى:-
- ١- تكسير الأحماض الأمينية الحرة أو المرتبطة (البروتين) وتصبح مركبات غير مناسبة غذائيا (مثل تكسير السستئين والميثيونين) .
 - ٢- تكوين جزيئات معقدة لا تمتص فى الأمعاء مثل مركبات ميلارد-Mail-lard الناتجة من تفاعل الليسين مع السكريات المختزلة.
 - ٣- يحدث تغيير فى نوعية ونمط Pattern الأحماض الأمينية وهذا يظهر عند مقارنة التركيب قبل وبعد المعاملات التالية:-
 - ٣- المعاملة الحرارية مثل (التجفيف والتعقيم) .
 - ٤- الخبز (طحن وتحميص Roasting) .
 - ٥- المعاملة بالقلوى لتنقية البروتينات لتحسين خاصية ذوبانها أو تكسير المواد السامة.
 - ٦- التخمر.
 - ٧- إستخدام مواد إضافية مثل الكبريتيت Sulfite وفوق أكسيد الهيدروجين .. الخ.

٨-٩-: الكشف عن غش الأغذية

١) استخدام الأحماض الأمينية الحرة

أ- العصائر

تحتوى كل عصائر الفاكهة على نموذج محدد يبين نوعية وتركيز الأحماض الأمينية. وللتأكد من نقاوة ومصدر العصير يجب مقارنة قيم الأحماض الأمينية فى العصير بقيم الأحماض الأمينية القياسية.

ب- منتجات اللحوم

٨- استخدام خليط من الأحماض الأمينية القياسية ومقارنتها بنوعية الأحماض الأمينية فى اللحم معرفة نسبة الجلوتامات المضافة إلى اللحم لتحسين مذاقه.

٩- الكشف عن إضافة لحم الدواجن إلى منتجات اللحوم الحمراء معتمدا على نسبة ثنائى الببتيد dipeptide ratio : أنسرين/ كارنوسين (Anserine / Carnosine)

٢) استخدام الأحماض الأمينية الكلية

أ- فى الخمور Wines

يظهر من نموذج الأحماض الأمينية بعد التحليل المائى للخمور التى من مصدر موثوق Certified origin نوعية العنب المستخدم من هذا المصدر. ولمعرفة النسبة المئوية لاحتمال وجود خممر من مصدر آخر، فإنه تقارن قيم الأحماض الأمينية النسبية بالأحماض الأمينية المكونة لمصدر خممر قياسى Wine standard.

النسب النووية لبعض الأحماض الأمينية في بعض عصائر الفاكهة

الفاكهة	أرجنين	آلانين	برولين	جلوتاميك	اسباراجين	سيرين	أسبارنيك
برتقال	١٩,٤	٤,٦	٣٢,٠	٣,٦	١٣,٧	٥,٩	٩,٧
جريب فروت	١١,٦	٦,٤	١٦,٨	٤,٨	١٧,٦	٨,٨	٢٢,١
ليمون	١,٤	٨,٨	٢٠,٩	٩,٢	١٥,٢	١٥,٥	٢٢,٥
تفاح	-	٣,٧	٠,١	٥,٧	٦٨,٩	٢,٩	١٦,٨
عنب	٣١,٤	١٢,٤	٣١,٤	٥,٣	٢,١	٣,٦	٣,٧
قراسيا	١,٤	٢,١	٦,١	١,٤	٧٨,٧	١,١	٣,٣
فراولة	١,١	١٥,٤	٠,٨	٧,٩	٥٣,٥	٦,٥	٧,٧
أنيس	٢,٣	١١,٥	٢,٤	٣,٨	٥١,٠	١٤,٥	٨,٩

يظهر هذا الجدول إختلاف واضح في كمية كل حمض أميني تبعاً لنوعية عصير الفاكهة

نماذج لقيم الأحماض الأمينية في بعض أصناف الخمور

الحمض الأميني	Cotes du Rhone	Bordeaux	Bourgogne
حمض أسبارتيك	٤,٧	٣,٢	٥,٠
ثريونين	٢,٧	٢,٠	٣,٨
سيرين	٣,٦	٢,٧	٤,٢
حمض جلوتاميك*	٨,٥	٤,٩	١٠,٨
برولين*	٤٧,٥	٦٤,٣	٢٩,٩
جليسين	٧,٢	٥,٠	٧,٣
آلانين*	٧,٢	٥,٤	١٠,٩
سستين	١,٨	٠,٩	١,٣
فالين	٢,٤	٢,٠	٢,٩
ميثيونين	٠,٤	٠,٣	٠,٤
أيروليسين	١,٥	١,٢	١,٧
ليوسين	٢,٠	١,٨	٢,١
تيرورين	١,٢	٠,٩	١,١
فينيل ألانين	١,٢	٠,٩	١,٣
هستيدين	٠,٩	٠,٥	٠,٨
ليسين	٢,٣	١,٧	٢,٢
أرغينين	٣,١	١,٢	٥,٦

* تدل هذه العلامة على وجود فروق واضحة بين هذه الأنواع من الأحماض الأمينية وأصناف الخمور المذكورة.

تميز بعض المصادر البروتينية الهامة عن طريق استخدام نسب بعض الأحماض الأمينية

صويا	قمح	بيض	شرش اللبن	كازين	اللبن	بلازما الدم	جيلاتين	تسليج حيواني	نسب الأحماض الأمينية
١,٨٤٠	١,٩١٦	١,٤١٩	١,٣٧٩	٠,٩٠٧	١,٠٠٦	١,١٥٣	١,٥٩٢	١,٢٠٧	أسبارتك / ليسين
١,٣٤٣	١,٧٢١	١,٥٤٧	٠,٧٦٧	١,٣٤٢	١,٢١٦	١,٠٣١	١,٧٧٤	١,٠٨٨	سيرين / ثريونين
٠,٨٥٨	٢,١٣١	١,٠٥٣	٠,٦٤٥	٠,٧٤٩	٠,٧٣٠	٠,٧٧٨	٠,٩٠٠	٠,٦٥١	سيرين / ليسين
٠,٦٥٩	١,١٠٠	١,١٢٣	١,٨٥٩	١,٤٩٨	١,٥٩٧	١,٠٦٨	٠,٣٧١	٠,٧١٤	سيرين / أرجينين
١,٦٠٨	٧,٠١٦	١,٢٩٧	١,٦٤٣	٣,١٠١	٢,٦٢١	١,٤٠٤	١,٧٧١	١,٤٦٤	جلوتاميك / أسبارتك
٤,٣١٣	٩,٦٦٢	٢,٣٩٧	٣,٥٩٨	٧,١٢٩	٦,٢١١	٢,٦٦٨	١,٠٦٠	٢,٣٢٩	جلوتاميك / ألانين
٢,٩٥٧	١٣,٤٤٢	١,٨٤١	٢,١٠١	٢,٨١٢	٢,٦٣٠	١,٦١٨	٢,٨١٩	١,٧٤٥	جلوتاميك / ليسين
١,٢٤٥	٢,٨٩٧	١,١٩١	١,٢٣٢	١,١٨٨	١,٢٠٠	١,٠٦٤	٠,١٢٩	١,١١٧	ليوسين / ليسين
٠,٧٧٥	٠,٦٨٢	٠,٧٧٦	٠,٩٠١	١,٠٦٧	١,٠١٤	٠,٩٣٩	٠,٣٠٩	٠,٨٨٤	تيروزين / فينيل ألانين
١,٣٠٣	١,٩٣٩	٠,٩٣٨	٠,٣٥٣	٠,٥٠٠	٠,٤٥٨	٠,٧٢٩	٢,٤٢٥	٠,٩١٠	أرجينين / ليسين
٠,٥٤٩	٠,٨٧٣	٠,٦٠٢	٠,٤٨٤	٠,٧٣٦	٠,٦٨١	٠,٥٧٠	٠,٢١٢	٠,٥١٨	أحماض أمينية حامضية / أحماض أمينية قاعدية

ب - فى اللحوم ومنتجاتها Meat and meat products

(١) يمكن الكشف عن وجود أنواع من اللحوم الرخيصة الثمن فى اللحم حيث أن وجود المركب 1-methylhistidine يدل على الخلط بلحوم الدواجن. كما أن وجود 3-methyl Histidine يدل على خلط اللحم بلحم الخنزير كما أن زيادة نسبة الهستيدين الى الأرجنين فى اللحم يدل على وجود لحم الحصان.

(٢) تقدير الكولاجين أو محتوى الأنسجة الضامة Connective

tissue content (CTC) بتقدير محتوى الحمض الأميني هيدروكسي برولين من المعادلة.

$$CTC \% = OH Pro \% \times 8$$

أو بتقدير محتوى الجليسين

$$CTC \% = gly \% - 4.2 / 23.0 - 4.2 \times 100$$

$$= 5.32 \times gly \% - 22.3$$

الكشف عن بروتينات من مصادر غير اللحمية Non meat protein

(١) الاعتماد على نسب أحماض أمينية معينة Amino acid ratio.

(٢) المقارنة باستخدام لحوم قياسية Meat standard.

(٣) تقدير المحتوى البروتيني (Y) الذى يعتمد على محتوى الأحماض الأمينية الكلية (X) باستخدام المعادلة التالية:-

$$Y = 1.014 X - 0.791$$

أى بمعرفة كمية الأحماض الأمينية الكلية (X) يمكن معرفة المحتوى البروتيني فى العينة (Y).

References

- AOAC, Association Official Methods of Analysis, 15th ed. By Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1990).
- Brueckner, H., Wittner, R. and Godel, H.J., J. Chromatogr. 476:73 (1989).
- Chang, H., Tsai, C. and Li, C., Quantification of racemization of amino acids in alkaline-treated duck eggs by micellar capillary electrophoresis. J. Agric & Food Chem. 47 (2) :479- 484 (1999).
- Cohen, S.A. and Michaud, D.P., Anal. Biochem. 211:279 (1993).
- Cousin, M.A., Zeidler, C.S and Nelson, P.E.J, Food Sci.: 49: 430 (1984)
- FAO/WHO Ad Hoc Expert committee, Energy and protein Requirements, WHO Technical Report Series; no.522; FAO Nutrition Meetings Report Series; no.52.
(WHO, Geneva, FAO, Rome, 1973).
- Farag, R. S., Youssef, A.A., Radwan, A.A., Kderaba, AH and Ismail, A.I. Biochemical studies on pepper seeds at different maturity stages and stored for various periods.
Fette Seifen Anstrichmittel 84 (9) 366-371 (1982).
- Farag, R.S., Fayza, A.Taha and El-Sherbini, N.R.
Chemotaxonomy studies on leaves of Jojoba and Pawpaw plants.
Egypt.J.Hort.14(1): 1-8 (1987).

- Farag, R.S., Shaban, OA, Ragab, AA and Abd El-Aziz, NM
Chemical evaluation of macadamia and pritchardia seeds. Grasas Y Aceites 41: 313-319 (1990)
- Gilman, L.B. and Woodward, C., Current Research in protein Chemistry, Academic Press, San Diego (1990).
- Fouques, D. and Landry, J. Analyst 116:529 (1991)
- Godel, H. and Seite, P., Hewlett-Packard Application note No. 12-5091- 0774 (1991).
- Holme, D.J. and Peck, H., Analytical Biochemistry 2ed., Longman Scientific & Technical, John Wiley and Sons, New York (1993)
- HP Amino quant Series II, Operator's Handbook, HP Part No. 01090- 90025 (1990).
- Jones, B. N., Paabo, S. and Stein, S., J. Liq. Chromatogr. 4:565 (1981).
- Lacey, J.M. and Wilmore, D.W., Nutr. Rev. 48:297 (1990)
- Lai, F. and Sheenan, T., Biotechniques 14:642 (1993)
- Leo M.L Nollet (ed). Handbook of Food Analysis, Marcel Dekker, Inc, New York, Basal, Hong Kong (1996).
- Rattenbury, J. M. (ed). Amino Acid Analysis. John Wiley and Sons, New York (1981).
- Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New York (1979).
- Snyder, L.R., Glajch, J.L. and Kirkland, J.J., Practical HPLC Method Development. John Wiley and Sons, New York (1988).

- Turnell, D.C. and Cooper, J.D.H. Clin Chem. 28:527 (1982).
- Umagat, H., Kucera, P. and Wen, L.F., J.Chromatogr. 241: 324 (1982).
- Wiedmeir, V.T., Porterfield, S.P. and Hendrich, C.E., J. Chromatogr. 231: 410 (1982).

نبذة عن المؤلف

المؤهلات العلمية:-

- بكالوريوس فى العلوم الزراعية «شعبة الكيمياء الحيوية» (١٩٦٣) - ماجستير فى العلوم الزراعية «كيمياء حيوية» جامعة القاهرة (١٩٦٦) - دكتوراه فى فلسفة العلوم الكيميائية «كيمياء الليبيدات» جامعة لندن (١٩٧٤) .

التدرج الوظيفى:-

- معيد بقسم الكيمياء الحيوية (١٩٦٣-٦٧) - مدرس (١٩٧٤-٧٩) - أستاذ مساعد (١٩٧٥-٨٤) - أستاذ (١٩٨٤) - رئيس قسم الكيمياء الحيوية (١٩٨٨-١٩٩٤) .

الأوسمة والنياشين الحاصل عليها (محلية وأجنبية):-

جائزة الدولة للتشجيعية ووسام العلوم والفنون من الطبقة الأولى عام ١٩٧٨ ثم مرة أخرى عام ١٩٨٤ - جائزة القرن العشرين من المركز العالمى للسيرة الذاتية- كامبريدج- إنجلترا (١٩٩٧) .

مظاهر التقدير الأخرى:-

اختير بصفته الشخصية لاعطاء محاضرات عن الزيوت الطيارة بموسكو مثلا لشركة بارفيكو (١٩٨٧) ومحاضرات عن التحليل الكروماتوجرافى ممثلا لشركة باى يونيكام (١٩٨٩) - رشح من قبل جامعة القاهرة لنيل جائزة الدولة التقديرية (١٩٩١) - رشح أيضا من قبل المعهد الأمريكى للسيرة الذاتية لجائزة الإنجازات مدى الحياة (١٩٩٧) - أستاذ ومحاضر فى المؤتمر العالمى الخامس عن وقاية الأغذية المحفوظة بفرنسا (١٩٩٠) - رئيس احدى جلسات مؤتمر الألوان بزراعة الإسماعيلية (١٩٩٣) - أسند إليه مراجعة كتابى «تحاليل كيميائية وفيزيائية بمركز التعليم المفتوح بجامعة القاهرة (١٩٩٣) وزيوت الطعام واستخداماتها لمركز الترجمة بجامعة الملك سعود (١٩٩٣) - أستاذ ومحاضر وضييفا متميزا فى مؤتمر الزيوت العطرية الذى نظمته شركة يونج ليفينج

بأمريكا (١٩٩٥) - تم الإستعانة بأجزاء من أبحاثه بنشرها في بعض الكتب العلمية المتخصصة بأمريكا - اختير عضوا في: الجمعية الأمريكية للزيوت (١٩٧٨)، الموسوعة القومية التي اصدرتها الهيئة العامة للاستعلامات بمصر (١٩٨٩)، الجمعية الأمريكية لتقدم العلوم (١٩٩٢)، الجمعية الدولية لكيمياء الحبوب بفرنسا (١٩٩٣)، أكاديمية نيويورك للعلوم (١٩٩٤)، مؤسسة ماركوس الأمريكية ضمن شخصيات الموسوعة العالمية ومن هم هؤلاء في العالم، عامي (١٩٩٦، ١٩٩٧)، موسوعة المركز العالمي للسيرة الذاتية بجامعة كامبريدج إنجلترا (١٩٩٧) - المعهد الأمريكي للسيرة الذاتية ABI ضمن شخصيات الموسوعة العلمية للعلماء المتميزين (١٩٩٧) - محكم دولي في: مجلة كيمياء الأغذية والزراعة العالمية بأمريكا (١٩٩٥)، المجلة العالمية لعلوم الأطعمة والتغذية بإنجلترا (١٩٩٧).

اللجان والهيئات التي شارك فيها:-

لجنة التحرير والنشر بالمجلة العلمية بكلية الزراعة جامعة القاهرة (١٩٧٥ - ١٩٩٦) - الهيئة المصرية للتوحيد القياسي وجودة الإنتاج - لجنة تقييم أبحاث وترقية أعضاء هيئة التدريس - اختير ضمن الوفد المصري المشارك في اللقاء المصري والفرنسي حول مواصفات زيت الشلجم (١٩٨٧) - الملتقى العلمي حول إنتاج الزيوت بأكاديمية البحث العلمي والتكنولوجيا (١٩٩١) - حلقة عمل عن غش الزيوت والدهون وصحة الإنسان التي أقامتها الجمعية المصرية المركزية لحماية المستهلك بالتعاون مع برنامج الأمم المتحدة للتنمية (١٩٩٧) - عضوا في اللجنة القومية للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية بأكاديمية البحث العلمي والتكنولوجيا (١٩٩٧).

أهم المؤتمرات والاجتماعات التي حضرها أو مثل بلاده فيها:-

المؤتمر العلمي الثالث عن أكسدة الليبيدات بفرنسا (١٩٧٣) - ندوة عن اصابة البذور الزيتية بالفطريات بجامعة شمال شرق ويلز - إنجلترا (١٩٧٨) - ندوة عن استخدام الفطريات لإنتاج الدهون بجامعة شمال شرق ويلز - إنجلترا (١٩٨٧) - المؤتمر القومي الأول (١٩٨١) والثاني (١٩٨٥) والرابع (١٩٩٢) للكيمياء الحيوية بمصر - المؤتمر الدولي الجديد في

تكنولوجيا الغذاء لحفظه وتوفيره (١٩٨١) - مؤتمر جامعة البحث الألمانية (١٩٩٢) - أعياد العلم بسوريا الثانى والثلاثون (١٩٩٢) والثالث والثلاثون (١٩٩٣) والرابع والثلاثون (١٩٩٤) - مؤتمر البحث العلمى ودوره فى المحافظة على التنوع البيولوجى فى الوطن العربى بسوريا (١٩٩٥) - مؤتمر اتحاد جامعات دول البحر المتوسط (١٩٩٦) - المؤتمر العالمى التاسع عن السموم الفطرية بإيطاليا (١٩٩٦) - المؤتمر العالمى السابع من حماية الأغذية المصنعة بالصين (١٩٩٨) - الندوة الأولى لسلامة الأغذية بالسعودية (٢٠٠٠) - الندوة الثانية لآفاق البحث العلمى فى العالم العربى بالشارقة دولة الامارات العربية المتحدة (٢٠٠٢) .

أهم المؤلفات والأبحاث العلمية المنشورة:-

قام بتأليف ثلاثة كتب وهى «التحليل الكروماتوجرافى» (رقم الإيداع ٧٨١٧ / ١٩٩٠) - «كتاب كيمياء الليبيدات» (رقم الإيداع ٣٥٧٥ / ١٩٩١) - «التحليل الطبعية والكيمائية للزيوت والدهون والزيوت العطرية فى المجلات العالمية الأمريكية الأوربية والمصرية» . قام بالإشتراك مع بعض أعضاء هيئة التدريس بكلية الزراعة جامعة القاهرة بتأليف كتاب «أساسيات الكيمياء الحيوية» . (رقم الإيداع ١١٧٠٠ / ٩٩) .

رقم الإيداع : ٢٠٠٣/١٩٧١٦

ISBN : 977-281-232-0

مطابع الدار الهندسية

تليفون/فاكس : ٥٤٠٢٥٩٨